

Aus dem
Institut für Mikrobiologie und Hygiene
(Leiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. U.-B. Göbel)
Universitätsklinikum Charité
Fachbereich Humanmedizin
Humboldt - Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Antigenerkennung
während unterschiedlicher
Stadien der
Helicobacter pylori - Infektion**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Galip Karaali
aus Antakya

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. U. B. Göbel
2. Prof. Dr. med. P. Malfertheiner
3. Prof. Dr. S. Suerbaum

Datum der Promotion: 24.06.2005

Teile dieser Arbeit wurde unter folgendem Titel veröffentlicht :

Haas, G., Karaali, G., Ebermayer, K., Metzger, W.G., Lamer, S., Zimny-Arndt, U., Diescher, S., Goebel, U.B., Vogt, K., Roznowski, A.B., Wiedemann, B.J., Meyer, T.F., Aebischer, T., Jungblut, P.R. (2002) : Immunoproteomics of Helicobacter pylori infection and relation to gastric disease. Proteomics 2 :313-324.

Teile dieser Arbeit wurde beim Europäischen Patentamt unter folgendem Titel angemeldet :

Method for identifying Helicobacter antigens (Patent Nr.01931657.9-2405-EP0104728)

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|----------|
| 1 EINLEITUNG | 7 |
| 1.1 Klinische und pathologische Bedeutung von <i>Helicobacter pylori</i> nach den Vorgaben der Literatur | 7 |
| 1.2 Epidemiologie der <i>Helicobacter pylori</i> - Infektion | 8 |
| 1.3 Morphologie und Pathogenität | 10 |
| 1.3.1 Morphologie von <i>Helicobacter pylori</i> | 10 |
| 1.3.2 Virulenz und Pathogenität von <i>Helicobacter pylori</i> | 10 |
| 1.4 Klinik der <i>Helicobacter pylori</i> - Infektion | 13 |
| 1.5 Diagnostik der <i>Helicobacter pylori</i> -Infektion | 14 |
| 1.6 <i>Helicobacter pylori</i> - induzierte Entzündung und Immunreaktion | 15 |
| 1.7 <i>Helicobacter pylori</i> - assoziierte Erkrankungen | 17 |
| 1.7.1 Gastritistypen | 17 |
| 1.7.2 <i>Helicobacter pylori</i> und Gastritis | 19 |
| 1.7.3 <i>Helicobacter pylori</i> und Ulkuserkrankungen | 20 |
| 1.7.4 <i>Helicobacter pylori</i> und Magenkarzinom | 21 |
| 1.7.5 <i>Helicobacter pylori</i> und gastrointestinale Lymphome | 22 |
| 1.7.6 <i>Helicobacter pylori</i> und funktionelle Dyspepsien | 22 |
| 1.7.7 Bedeutung von <i>Helicobacter pylori</i> bei Dermatosen | 23 |
| 1.8 Therapiemöglichkeiten bei <i>Helicobacter pylori</i> - Infektionen | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 2 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG | 26 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 28 |
| 3.1 Gastroskopische <i>Helicobacter pylori</i> - Diagnostik | 29 |
| 3.1.1 Nachweis der Ureaseaktivität von <i>Helicobacter pylori</i> (CLO-Schnelltest) | 29 |
| 3.1.2 Histologischer Nachweis von <i>Helicobacter pylori</i> | 30 |
| 3.1.3 Nachweis von <i>Helicobacter pylori</i> auf Kultur | 31 |
| 3.2 Serumdiagnostik nach ELISA | 31 |
| 3.2.1 Serumproben | 33 |
| 3.2.2 Material und Geräte | 33 |
| 3.2.3 Ablaufschema der serologischen Identifikationen | 33 |
| 3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese und Western - Blotting | 34 |
| 3.3.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese | 34 |
| 3.3.1.1 Herstellung der bei der 2D-Elektrophorese verwendeten Lösungen | 36 |
| 3.3.1.2 Durchführung der 2D - Elektrophorese | 39 |
| 3.3.2 Blotten („Westernblot“) | 44 |
| 3.3.2.1 Durchführung | 44 |
| 3.4 Färbeverfahren | 45 |
| 3.4.1 Gelfärbeverfahren | 45 |
| 3.4.1.1 Coomassie Brilliant Blue - Färbung | 45 |
| 3.4.1.2 Silberfärbung | 46 |
| 3.5 Auswertung von zweidimensionalen Gelen und Blots | 48 |
| 4 STATISTISCHE METHODEN | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 5 ERGEBNISSE | 50 |
| 5.1 Diagnostik und Prävalenzen einer <i>Helicobacter pylori</i> - Infektion | 51 |
| 5.1.1 CLO - Test und <i>Helicobacter pylori</i> - Anzucht | 51 |
| 5.1.2 Histologische Untersuchungsergebnisse | 51 |
| 5.1.3 Ergebnisse der ELISA - Tests | 52 |
| 5.1.4 Auswahlkriterien zur Definition des <i>Helicobacter pylori</i> - Status | 54 |
| 5.1.5 Gruppeneinteilung für die Analyse der Immunoblots | 55 |
| 5.2 Analyse von zweidimensionalen Gelen und Blots | 56 |
| 5.3 Qualitative Auswertung der Immunoblots | 61 |
| 5.4 Quantitativer Vergleich der Immunoblots von <i>Helicobacter pylori</i> - positiven Patienten mit <i>Helicobacter pylori</i> - negativen Patienten | 66 |
| 5.4.1 Häufig erkannte Antigene in beiden Gruppen | 71 |
| 5.4.2 Durch <i>Helicobacter pylori</i> - negative - Seren selten erkannte Proteine | 72 |
| 5.4.3 Antigene mit höherer Frequenzstärke in <i>Helicobacter pylori</i> negativen Seren | 73 |
| 5.5 Qualitativer und quantitativer Vergleich der Immunoblots bei den Krankheitsgruppen Gastritis, Ulkus und Karzinom | 74 |
| 5.5.1 Antigene mit größerer Frequenzstärke in Karzinomseren | 78 |
| 5.5.2 Statistisch auffälligste Antigene bezüglich der Frequenzstärke | 80 |
| 5.6 Untersuchungen von Serumpools | 80 |
| 6 DISKUSSION | 82 |
| 6.1 Bedeutung von Serodiagnostik | 82 |
| 6.2 Bedeutung der zweidimensionalen Gelelektrophorese | 83 |
| 6.3 <i>Helicobacter pylori</i> - spezifische Antigene | 84 |
| 6.4 <i>Helicobacter pylori</i> - Antigene und Bezug zur Krankheit | 87 |
| 6.5 Serien - Spots | 89 |
| 6.6 Analyse der Serumpools | 90 |

| | |
|-------------------------------------|------------|
| 7 ZUSAMMENFASSUNG | 91 |
| 8 LITERATURVERZEICHNIS | 93 |
| 9 ANHANG | 107 |
| 10 DANKSAGUNG | 111 |
| 11 LEBENSLAUF | 113 |
| 12 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG | 114 |

1 EINLEITUNG

1.1 Klinische und pathologische Bedeutung von *Helicobacter pylori* nach den Vorgaben der Literatur

Das Vorkommen einer bakteriellen Besiedlung der Magenschleimhaut wurde erstmals 1883 von B i z z o z e r o beschrieben (BIZZOZERO, 1893). Vorangehend hatten bereits mehrere Autoren über spiralig geformte und gekrümmte Bakterien im Magen von Mensch und Tier berichtet. So beschrieb 1874 B o e t t c h e r erstmals spiralförmige Organismen in Magenproben von Patienten mit perforierendem Magenulkus (BOETTCHER, 1874). Weitere Beschreibungen folgten zum Beispiel von Krienitz (KRIENITZ, 1906) über das Auftreten von Bakterien bei Magenkarzinomen.

F r e e d b e r g und B a r r o n wiesen vergleichbare Bakterien histozyto-chemisch im Zusammenhang mit Magenulkus in Gewebeproben von Magenteilresektaten nach (FREEDBERG and BARRON, 1940). Die Erforschung der spiralförmigen Bakterien und ihrer potentiell pathogenen Bedeutung war jedoch erst mit ihrer Kultivierung möglich (MARSHALL and WARREN, 1984). Die Autoren leiteten damit eine enorme Entwicklung in der pathogenetischen Betrachtungsweise von Magenerkrankungen ein. In der Folge konnten wesentliche Erkenntnisse zur ursächlichen Rolle von *Helicobacter pylori* bei der Entstehung von Gastritiden, Magen- und Duodenalulkus, MALT (Mukosa-assoziiertes-lymphatisches-Gewebe)-Lymphomen und Karzinomen des Magens gewonnen werden.

Infektionen mit *H. pylori* verlaufen grundsätzlich chronisch (BLASER und PARSONNET, 1994). Obwohl das Auftreten dieser Bakterien immer mit einer Entzündung der Mukosa einhergeht (auch als Typ-B-Gastritis bezeichnet), bleiben die meisten *H. pylori*-positiven Individuen asymptomatisch. Auf der anderen Seite kann potentiell jede durch *H. pylori* verursachte chronische Entzündung mit schweren gastroduodenalen Komplikationen

einhergehen. Zahlreiche Studien belegen eine hohe Korrelation zwischen einer Magenschleimhautbesiedlung durch *H. pylori* und Gastritis sowie peptischem Ulkus (RATHBONE et al., 1986; BLASER, 1990). Darüberhinaus ist eine Infektion mit *H. pylori* als Risikofaktor für die Bildung eines Magenkarzinoms anzusehen und wird von der IARC (International Agency on Research of Cancer) als Karzinogen der Gruppe 1 bezeichnet (BLUM et al., 1997).

H. pylori siedelt sich vorwiegend im Antrumbereich des Magens in- und unterhalb der Schleimschicht an. Das Bakterium besitzt eine hohe Affinität zum gastrischen Oberflächenepithel. Die ätiologische Bedeutung des Erregers bei der Pathogenese von Gastritiden und peptischen Ulzera wurde mittlerweile durch zahlreiche Studien bestätigt (BLASER, 1992). Die Kolonisierung des Magenepithels durch *H. pylori* hat zunächst eine chronische Oberflächengastritis zur Folge, die häufig symptomfrei verläuft.

Eine chronische Gastritis kann jedoch den Boden für peptische Ulzera bilden und zu einer chronisch atrophischen Gastritis führen (BLASER, 1993). Diese stellt eine potentielle Vorstufe der Entstehung des Magenkarzinoms dar, weshalb *H. pylori* heute als Karzinomrisikofaktor gilt (FORMAN et al., 1991; PARSONNET et al., 1991). Mehr als 90% aller Patienten mit Magenfrühkarzinomen sind mit *H. pylori* infiziert (ASAKA et al., 1994; FIOCCA et al., 1993).

1.2 Epidemiologie der *Helicobacter pylori* - Infektion

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass aller Wahrscheinlichkeit nach mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert ist (POUNDER und NG, 1995). Im allgemeinen ist in den Entwicklungsländern eine höhere Infektionsprävalenz zu verzeichnen als in den Industrieländern. In Industrieländern wie USA, Großbritannien und Australien erreicht die Infektionsprävalenz eine Rate von 19% bis 57%, dagegen in den Entwicklungsländern wie China, Thailand und Indien eine Rate von 44% bis 79% (GRAHAM et al., 1991a; GRAHAM et al., 1991b; MITCHELL et al., 1992a; PEREZ - PEREZ et al., 1990; SITAS et al., 1991; WHITAKER et al., 1993).

Während bei <20% asymptomatischer Probanden der Altersgruppe <30 Jahre eine *H. pylori*-Infektion nachweisbar ist, erhöht sich die Nachweisrate auf 40 - 60% in der Altersgruppe der 60jährigen (DOOLEY et al., 1988).

Die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion zeigt demnach eine klare Altersabhängigkeit: In Industrieländern sind Kinder zu etwa 5% IgG positiv, Erwachsene von 20 Jahren zu etwa 20%, während die Altersgruppe der 50 - 60 jährigen zu etwa 70% seropositiv ist. In den sogenannten Entwicklungsländern findet die Infektion offensichtlich schon in einem frühen Lebensalter statt (FORMAN und WEBB, 1993). Man kann davon ausgehen, dass dort nahezu jeder Erwachsene infiziert ist (BLASER, 1997).

Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen *H. pylori*-Infektionen und epidemiologischen Risikofaktoren wie Rauchen, Tee-, Wein- und Biergenuß (KIST, 1988). Die Inzidenz von *H. pylori* - Infektionen wird bei Männern und Frauen etwa gleich hoch angesetzt (PEREZ - PEREZ et al., 1988).

Über die Infektionsquellen von *H. pylori* und den Übertragungsmodus ist noch wenig bekannt. Der Mensch scheint der natürliche Wirt zu sein. Es wird postuliert, dass sich der Erreger der menschlichen Mageninnenwand als seiner ökologischen Nische angepaßt hat (LEE und HAZELL, 1988). Die Annahme einer Übertragung von Mensch zu Mensch wird durch Beobachtung einer Erreger- und Antikörperprävalenz in Behindertenheimen (BERKOWICZ und LEE, 1987) und bei Familienangehörigen infizierter Kleinkinder (MITCHELL et al., 1987) unterstützt, durch andere Beobachtungen allerdings nicht bestätigt (JONES et al., 1987). Die Forschungsergebnisse sind demnach im Hinblick auf die möglichen Transmissionswege der *H. pylori*-Infektion als ungeklärt zu betrachten. Prinzipiell scheint sowohl der oro-orale als auch der oro-fäkale Übertragungsweg möglich zu sein (DYE et al., 1990; KRAJEN et al., 1989; LINDKVIST et al., 1996; MITCHELL et al., 1992b; RAEDSCH et al., 1989).

1. 3 Morphologie und Pathogenität

1.3.1 Morphologie von *Helicobacter pylori*

Der *H. pylori* ist ein ca. 0,6 µm breites, 2,5 - 3 µm langes, spiralig gewundenes, zum Teil gekrümmtes, bewegliches, gramnegatives Stäbchen, das unipolar 4 - 6 Geißeln besitzt. Seine charakteristische Stäbchenform wandelt sich unter ungünstigen Bedingungen über Zwischenstadien in persistierende kokkoide Formen um. Seine äußere Zellwand ist von einer rund 40 nm dicken Glycocalix umgeben, die sich aus ringähnlichen Untereinheiten mit Durchmessern von 12 - 15 nm zusammensetzt (GOODWIN et al., 1993).

H. pylori ist unter mikroaeroben Bedingungen in reichhaltigen Medien innerhalb 3 bis 5 Tagen kultivierbar.

Das Bakterium sezerniert eine Reihe spezifischer Enzyme, darunter Ureasen, Katalasen, Oxidasen, alkalische Phosphatase sowie mehrere Proteasen (GOODWIN et al., 1990), die seine Virulenz erhöhen.

1.3.2 Virulenz und Pathogenität von *Helicobacter pylori*

Weitere charakteristische Kolonisationsfaktoren von *H. pylori*, die ihm das Persistieren im Magenmilieu ermöglichen, sind neben der Bildung spezifischer Enzyme und Proteine seine Spiralform und Motilität und seine Fähigkeit zur Adhärenz. In Tabelle 1 sind diese und weitere Virulenzfaktoren zusammengefaßt und erläutert.

Tab. 1: Mögliche Virulenzfaktoren von *H. pylori*
(nach SUERBAUM, 1996)

| Virulenzfaktor | Wahrscheinliche Funktion |
|----------------------------|--|
| Urease | Säureproduktion, Metabolisierung von Harnstoff, Kolonisation, toxische Effekte (?) |
| Flagellen | Beweglichkeit, Chemotaxis, Kolonisation und Persistenz |
| Adhäsine | Anheftung an die Mukosazelle Rolle bei Infektion (?) |
| Zytotoxin | Gewebeschädigung, Beteiligung an der Ulzerogenese (?) |
| Ferritin - Homolog | Eisenspeicherung im Bakterium |
| Superoxiddismutase | Entgiftung toxischer Granulozytenstoffwechsel - Produkte, Funktion bei <i>H. pylori</i> unklar |
| Katalase | wie Superoxiddismutase |
| Hitzeschockproteine | Unterstützung der Proteinfaltung, Mithilfe beim Nickeleinbau in die Urease |
| Cag A - Antigen | Häufiger in <i>H. pylori</i> -Stämmen von Ulkuspatienten, Funktion unbekannt |

Um an die Magenmukosa adhäreren zu können, muss der Erreger das aggressive saure Milieu des Magenlumens überwinden. Hierbei kommen in erster Linie seine Glycocalix und die Expression einer *H. pylori*-spezifischen Urease zum Tragen. Die Glycocalix übt eine protektive Funktion gegenüber dem direkten Kontakt mit dem Umgebungsmilieu aus (GEESSEY, 1982) und ist somit ein entscheidender Kolonisationsfaktor (BLASER et al., 1988).

Die *H. pylori*-Urease stellt einen potentiellen säureresistenten Faktor dar. Sie wird in großen Mengen exprimiert, wirkt stark immunogen und ist vermutlich extrazellulär lokalisiert (DUNN et al., 1990). Das Enzym scheint nach neuesten Untersuchungen in Verbindung mit einem GroEL-Chaperonin-Homologen den Hauptbestandteil der *H. pylori*-Glycocalix zu bilden (DUNN et al., 1992). Durch die resultierende Bildung von

Ammoniak ist der Erreger resistent gegenüber dem sauren Milieu und kann dort persistieren (EATON et al., 1991). Das Enzym Urease, das die Hydrolisierung von Harnstoff zu Ammonium und Bicarbonat katalysiert, macht etwa 6% des Proteingehalts von *H. pylori* aus. Durch diese Reaktion steigt in unmittelbarer Nähe des Erregers der pH-Wert an und ermöglicht sein Überleben. Über die Ammoniumbildung übt sie indirekt eine toxische Wirkung auf die Epithelzellschicht aus.

Ein dritter protektiver Faktor ist die Katalase, die den Erreger vor den toxischen Fettsäuren aus neutrophilen Granulozyten und vor reaktiven Sauerstoffmetaboliten schützt (HAZELL et al., 1991). Hinzu kommen *H. pylori*-Proteasen, -Lipasen und -Phospholipasen, die die Viskosität und die hydrophobe Aktivität des Mukus herabsetzen (SAROSIEK et al., 1991). Sie schädigen die epitheliale Zellmembran durch Abbau von Lecithin und Produktion von Lysolecithin (SLOMIANI et al., 1989).

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor ist die Bildung von Zytotoxinen. Das vakulosierende Zytotoxin (Vac A) induziert in Kultur bei verschiedenen Epithelzelllinien die Bildung von Vakuolen (COVER et al., 1990). Es handelt sich dabei um ein 87-kDa Protein, das durch einen aktiven Mechanismus aus der Bakterienzelle in das umgebende Milieu sezerniert wird. Der Wirkmechanismus des VacA-Toxins ist bisher nicht vollständig aufgeklärt (MALFERTHEINER, 1996). Der serologische Immunnachweis dieses Proteins mittels ELISA ist ein spezifischer Indikator einer *H. pylori*-Infektion und bei allen Patienten mit Ulcus duodeni zu erbringen (COVER et al., 1990).

Das 128 kDa - Protein Cag A ist seit langem als ein stark immunogenes und daher für serologische Untersuchungen verwendbares Antigen bekannt. Das Cag A Antigen wird nicht von allen *H. pylori*-Stämmen gebildet, und die Bildung dieses Antigens korreliert statistisch deutlich mit der Bildung des VacA-Toxins. Ursprünglich wurde daher angenommen, dass das Cag A-Antigen eine Rolle bei der Zytotoxinbildung spielte (daher der Name zytotoxinassoziiertes Gen) (COVACCI et al., 1993). Mutanten auf dem Cag A-Gen zeigen jedoch keine Veränderung der Zytotoxinexpression, so dass die funktionelle Bedeutung des Cag A-Antigen weiterhin unbekannt ist (SCHMITT et al., 1994). Interessanterweise zeigten serologische Studien eine starke Korrelation

zwischen dem Auftreten von Antikörpern gegen Cag A und dem Grad gastroduodenaler Läsionen (COVACCI et al., 1993).

Klinische Isolate von *H. pylori* lassen sich hinsichtlich ihrer Expression zwei Typen zuordnen. Der *H. pylori* vom Typ I exprimiert ein vakuolisierendes Zytotoxin (Vac A) und ein mit diesem Zytotoxin assoziiertes Protein (Cag A) während dem *H. pylori* vom Typ II diese Proteine fehlen. Die Fähigkeit zur Bildung dieser Proteine ist mit einer höheren Infektiosität und Pathogenität assoziiert. Liegt der Anteil an Typ I-Infektionen bei Gastritis-Patienten im Vergleich zu Infektionen vom Typ II bei 50 - 60%, so steigt er bei Patienten mit Duodenalulzera auf über 90% an. Diese unterschiedliche Pathogenität scheint der Grund dafür zu sein, dass zwar alle *H. pylori*-infizierten Personen histologisch eine Gastritis entwickeln, es aber bei nur etwa 10% der *H. pylori*-Infektionen zu Komplikationen wie peptischen Ulzera und zu möglichen Spätfolgen wie MALT-Lymphoms oder Adenokarzinoms des Magens kommt (RISCH, 1998).

1.4 Klinik der *Helicobacter pylori* - Infektion

Infektionen mit *H. pylori* können zu folgenden klinischen Manifestationen führen: transiente akute Dyspepsie, funktionelle (chronische bzw. chronisch-rezidivierende) Dyspepsie, peptische Ulzera des Magens und des Duodenums, Magenkarzinom und MALT-Lymphom des Magens. Im Gegensatz zur Typ-A-Gastritis, die als Autoimmunerkrankung die Corpusregion des Magens befällt und in deren Verlauf es zur Zerstörung der säureproduzierenden Parietalzellen kommen kann, ist die *H. pylori*-assoziierte Typ-B-Gastritis vorwiegend im Antrum nachzuweisen. Hier werden als Folge der Infektion schleimproduzierende Zellen durch eine Hypersekretion von Magensäure geschädigt. Es kann zum Auftreten von gastralen Metaplasien kommen, die sowohl eine aktive Duodenitis als auch als Spätfolge ein Magenkarzinom nach sich ziehen können.

Selbst bei Blutspendern, die anamnestisch und klinisch unauffällig waren, aber hohe *H. pylori*-spezifische IgG-Titer im Serum aufwiesen, wurde eine nicht unerhebliche Prävalenz gastroenterologisch pathologischer Befunde festgestellt: Ulcus duodeni 16,9%, erosive Duodenitis 13,5%, antrale Erosionen 10,5%, Ulcus ventriculi 6,8%,

Magenkarzinom 0,3%. Lediglich 13,9% der untersuchten Personen wiesen eine normale, histologisch unauffällige Schleimhaut auf (CASPARY und RÖSCH, 1997).

1.5 Diagnostik der *Helicobacter pylori* - Infektion

Tests zur Diagnose von *H. pylori* werden prinzipiell in die Kategorien invasiv (direkter Erregernachweis aus einer Biopsie der Magenschleimhaut nach Gastroskopie, Histologie, Urease-Schnelltest) oder nicht-invasiv (indirekter Nachweis: Serologie, Atemtest) unterteilt.

Invasive Methoden:

Die Isolierung und Anzucht von *H. pylori* in einem speziellen Medium oder Agar wird als Goldstandard betrachtet, da nur wenige in einer Biopsie enthaltene Erreger ausreichen, um bei optimalen Kulturbedingungen den Nachweis zu erbringen. Allerdings ist diese Methode des Keimnachweises von *H. pylori* äußerst aufwendig und deshalb für die Routinediagnostik nicht geeignet (AZUMA et al., 1996).

Daneben ist bei entsprechender Erfahrung und adäquater mikroskopischer Vergrößerung (40-fach) der Nachweis von *H. pylori* auch histologisch mittels Routinefärbung mit Silber, Haematoxylin/Eosin (HE) oder einer modifizierten Giemasafärbung möglich (MARSHALL und WARREN, 1984).

Beim Urease-Schnelltest handelt es sich um ein Nachweisverfahren, das unmittelbar nach gastroscopischer Gewebsentnahme durchgeführt wird. Die Probe wird in ein Testmedium gegeben, das aus einem harnstoffhaltigen Nährmedium und einem farbigen pH-Indikator besteht. Im Fall einer Infektion hydrolisiert das Bakterium den Harnstoff. Ammoniak hebt den pH-Wert an, wodurch es zum Farbumschlag der Testsubstanz kommt (MEGRAUD, 1996).

Nicht-invasive Methoden:

Der sogenannte ^{13}C -Atemtest nutzt die Urease-Enzymaktivität des Erregers. Mit Hilfe dieses Enzyms baut *H. pylori* Harnstoff zu CO_2 und H_2O ab. Der Test basiert auf dem Nachweis von ^{13}C markiertem CO_2 in der Ausatemluft nach Verabreichung von ^{13}C markiertem Harnstoff. Zur Durchführung des Tests wird eine erste Atemprobe als Nullwert gewonnen und dann markierter Harnstoff in Flüssigkeit aufgelöst. Dieses Harnstoffgetränk wird dem nüchternen Patienten oral verabreicht. Dreißig Minuten später wird eine zweite Atemprobe gewonnen. Liegt eine Infektion mit *H. pylori* vor, kann in der zweiten Atemprobe ein Anstieg des ^{13}C -haltigen CO_2 in der Ausatemluft des Probanden nachgewiesen werden (AZUMA, 1996).

Eine weitere Nachweismethode ist die Antikörperbestimmung gegen *H. pylori* im Serum. Sie zeigt an, dass sich der Proband zuvor mit dem Erreger infiziert hat, erlaubt jedoch keine Aussage darüber, ob eine aktive *H. pylori*-Infektion vorliegt.

Von den vier in der klinischen Praxis am häufigsten angewandten Testverfahren (Histologie, Ureaseschnelltest, ^{13}C -Atemtest und Antikörperbestimmung im Serum) genügen in der Regel zwei positive Ergebnisse, um einen Probanden als positiv für *H. pylori* einzustufen.

1.6 *Helicobacter pylori* - induzierte Entzündung und Immunreaktion

Als Folge einer Besiedlung der Magenschleimhaut mit *H. pylori* kommt es zu Entzündungsreaktionen, die durch eine starke Infiltration der Lamina propria mit Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet sind (Abbildung 1).

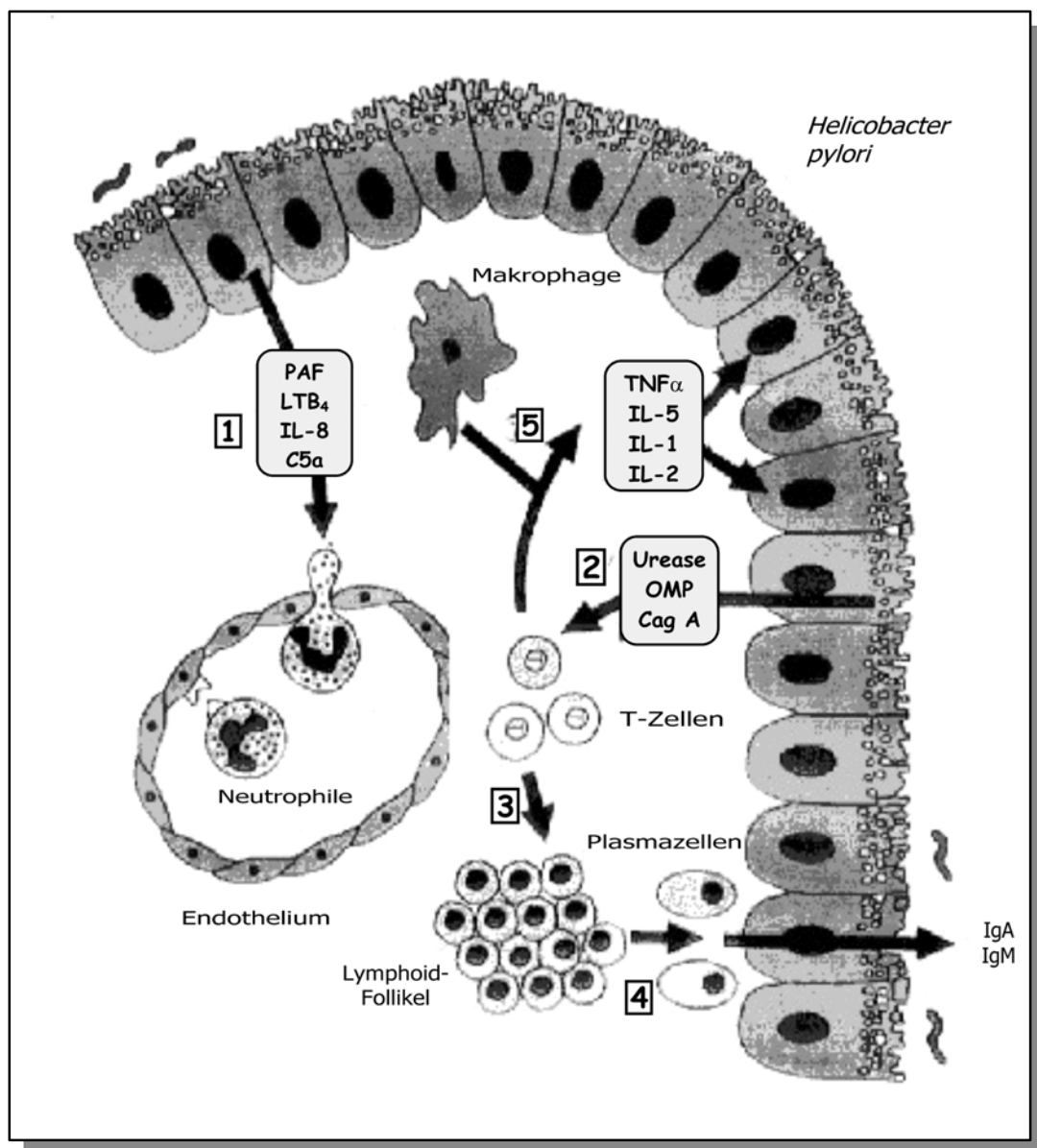


Abbildung 1: Schematische Darstellung der lokalen Immunantwort bei *H. pylori*-assoziiierter Gastritis (modifiziert nach CRABTREE, 1996). 1). Komponenten des Erregers stimulieren das Epithel zur Produktion chemotaktischer Substanzen. Dies führt zur Endothelanheftung von Granulozyten. 2). Stoffwechselprodukte von *H. pylori*, wie Urease, äußere Membranproteine und/oder Cag A überschreiten die Epithelbarriere und stimulieren das Einwandern von Granulozyten, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten. CD4⁺-T-Zellen unterstützen die Differenzierung von B-Zellen (3) zu Plasmazellen (4), die spezifische Antikörper produzieren. 5). Lymphozyten und Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine. Diese führen zur Aktivierung von Entzündungszellen und so zu einer Schädigung des Epithels. C5a = Komplementkomponente 5a, Cag A = Zytotoxin-assoziiertes Protein, IL = Interleukin, LTB₄ = Leukotriene B₄, OMP = äußere Membranproteine, PAF = Plättchenaktivierender Faktor, TNF α = Tumornekrosefaktor α .

Der Erreger *H. pylori* und seine Antigene befinden sich zunächst im Mukus der Mageninnenwand, wo sie die erste Immunantwort des Wirtes auslösen. Antigenspezifische Immunglobuline sind in der Folge jedoch lokal wie systemisch zu finden. Abbildung 1 zeigt die einzelnen Schritte der zellulären Immunantwort auf eine *H. pylori*-Infektion. Möglicherweise aktiviert das Bakterium die Synthese von Leukotrienen, Thromboxan und PAF (Platelet activating Factor), einem Entzündungsmediator für Neutrophile und Eosinophile. PAF wird von verschiedensten Zellen und auch von *H. pylori* produziert und stellt einen der potentesten Ulcerogene des Magendarmtraktes dar (DENIZOT et al., 1990). Mediatoren wie Interleukin-8 (IL-8) und das Komplementspaltprodukt C5a spielen ebenfalls eine Rolle bei *H. pylori*-assoziierten Entzündungsvorgängen (CRABTREE et al., 1992; NORGAARD et al., 1993; WALLACE et al., 1988). Daneben kommt es aufgrund weiterer *H. pylori*-Komponenten zu einer Stimulierung der Leukozytenmigration und im Anschluß daran zu einer Freisetzung der proinflammatorischen Substanzen $\text{TNF}\alpha$ und Interleukin 1, 2, 6 (IL-1, 2, 6) aus Lymphozyten und Makrophagen (TARKKANEN et al., 1993).

Die im entzündlichen Infiltrat auftretenden Plasmazellen sezernieren *H. pylori*-antigenspezifische Immunglobuline der Klasse G sowie sekretorische Immunglobuline der Klasse A (RATHBONE et al., 1987). Die aufgrund einer lokalen *H. pylori*-Infektion induzierte systemische, antigenspezifische humorale Immunantwort ist vorwiegend vom IgG- / IgA-Typ, deren Antikörperkonzentrationen im Serum nach therapeutischer Eradikation des Bakteriums abnehmen (VAN BOHEMEN et al., 1989). Eine IgM-Sekretion ist nur lokal in der akuten Phase der Infektion nachzuweisen (MARSHALL et al., 1985).

1.7 *Helicobacter pylori* - assoziierte Erkrankungen

1.7.1 Gastritistypen

Die Arbeitsgemeinschaft Gastroenterologische Pathologie in der Deutschen Gemeinschaft für Pathologie hat folgende Klassifikation der Gastritiden vorgeschlagen (HEILMANN et al., 1989; STOLTE und HEILMANN, 1989):

1. Autoimmun-Gastritis (Typ A)
2. Bakteriell bedingte (*H. pylori*-induzierte) Gastritis (Typ B)
3. Kombination einer Gastritis vom Typ A und Typ B
4. Chemisch-toxisch induzierte Gastritis (Typ C)
5. Lymphozytäre Gastritis
6. Sonderformen

Die *H. pylori*-induzierte Gastritis ist mit 80 - 90% aller Gastritiden die häufigste Gastritisform. Die C-Gastritis steht mit ca. 7 - 15% an zweiter Stelle. Relativ selten ist dagegen die Autoimmungastritis mit 3 - 6%. Alle anderen Formen sind sehr selten (STOLTE et al., 1990).

Bedingt durch ein Vorliegen von Antikörpern gegen Parietalzellen und den Intrinsic-Faktor tritt die Gastritis vom Typ A seltener auf als jene vom Typ B (STOLTE et al., 1989).

Die wesentlichen Unterschiede zwischen A und B-Gastritis sind (MALFERTHEINER, 1988):

Typ A

Säuresekretion vermindert /
fehlend

Gastrinspiegel erhöht

Antikörper gegen Belegzellen
und den Intrinsic-Faktor

Auftreten immunologischer,
endokriner Erkrankungen
wie Hypo-/ Hyperthyreose,
M. Addison, insulinabhängiger
Diabetes mellitus
(STRICKLAND et al., 1973)

Typ B

Säuresekretion meist normal

Gastrinspiegel normal

keine Antikörper gegen Belegzellen

kein Auftreten immunologisch
bedingter Erkrankungen

Corpusschleimhaut diffus
befallen

Corpusschleimhaut partiell befallen

1.7.2 *Helicobacter pylori* und Gastritis

Als Gastritis wird eine Magenschleimhautentzündung bezeichnet, wenn die normale Histoanatomie und Physiologie des Magens (MORRIS et al., 1993) gestört ist. Das typische klinische Bild eines Patienten mit Gastritis ist gekennzeichnet durch Erbrechen, Anorexie, Übelkeit, Gewichtsverlust oder Polydipsie (TWEDT und TAMS, 1989). Je nach Entzündungstyp werden akute, chronische und chronisch aktive Gastritiden unterschieden (PRICE, 1991). *H. pylori* bestimmt den Grad und die Aktivität der Gastritis, die im Antrum stärker als im Corpus ausgeprägt ist. Eine genauere Einteilung erlaubt das "Sydney-System" nach histologischen Gesichtspunkten (PRICE and MISIEWICZ, 1992). Dazu gehören:

1. Entzündungsgrad (Dichte der Infiltration mit inflammatorischen Zellen)
2. Entzündungsaktivität (intraepitheliale Neutrophileninfiltration)
3. Atrophie des Drüsengewebes
4. Dichte der *H. pylori*-Kolonisation
5. Intestinale Metaplasien

Die morphologischen Parameter werden auf einer Skala von 0 - 3 („keine Gastritis B“, „Gastritis B vom Grad 1“, „Grad 2“, „Grad 3“) (PRICE, 1991).

Eine *H. pylori*-assoziierte (Typ B-) Gastritis ist ausnahmslos auf das Magenantrum beschränkt. Mit fortschreitender Erkrankung kann allmählich auch die Korpusregion in das Entzündungsgeschehen miteinbezogen werden.

Einteilung und Graduierung der Gastritis werden je nach Art des Infiltrates beschrieben: Die seltene akute Gastritis weist ein neutrophiles granulozytäres Infiltrat auf, die je nach der Intensität in drei Schweregrade eingeteilt wird. Pathophysiologisch geht der akuten Gastritis eine Schädigung der Schleimhautbarriere voraus. Meist ist dabei nur die

Lamina mucosa betroffen, es kommen aber auch Ausdehnungen bis in die Lamina muscularis und die Lamina serosa vor.

Die chronische Gastritis zeigt ein lympho-plasmazelluläres Infiltrat mit vereinzelt eosinophilen Granulozyten. Je nach Stärke und Ausdehnung des Infiltrats wird zwischen einer minimalen, geringgradigen, mittelgradigen oder hochgradigen chronischen Gastritis unterschieden. Chronische Gastritiden lassen sich wie folgt einteilen (TWEDT und MAGNE, 1986):

1. Erosive Gastritiden
2. Nichterosive Gastritiden:
 - a. Oberflächliche chronische Gastritiden
 - b. Chronisch atrophische Gastritiden
3. Spezifische Gastritiden:
 - a. Chronisch hypertrophe Gastritiden
 - b. Eosinophile Gastritiden
 - c. Granulomatöse Gastritiden.

1.7.3 *Helicobacter pylori* und Ulkuserkrankungen

Per definitionem ist das Ulkus ein Gewebedefekt der Schleimhaut, der mindestens bis in die Lamina submucosa reicht. Unter dem Begriff peptische Ulzera werden histologisch gutartige Geschwüre der Schleimhaut des Magens (Ulcera ventriculi) und des Zwölffingerdarms (Ulcera duodeni) zusammengefaßt. Kennzeichnend für peptische Ulzera ist ein chronisch-rezidivierender Verlauf.

Das Risiko, an einem Duodenalulkus zu erkranken, ist bei Patienten, die an einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis leiden, 20fach erhöht (SIPPONEN et al., 1990).

STOLTE geht davon aus, dass 95% aller Ulcera duodeni Folgeerscheinungen einer *H. pylori*-Gastritis sind (STOLTE, 1994). Dem liegt die folgende pathogenetische Vorstellung zugrunde: Durch eine *H. pylori*-induzierte Antrumgastritis kommt es über die Stimulierung von G-Zellen zu einer vermehrten Gastrinsekretion. Dies führt zu einem temporären Überschuß an Magensäure und zu einem Anstieg der Säurekonzentration im Mukus, was wiederum oberflächliche Erosionen in der Duodenalschleimhaut

verursacht (LEVI et al., 1989). Im Rahmen von Regenerationsprozessen werden Teile der geschädigten, intestinalen Schleimhaut des Bulbus duodeni durch Magenschleimhaut (die säuretolanter ist) ersetzt. Erst diese gastrale Metaplasie ermöglicht ein Anhaften des *H. pylori* auch im Bereich des Duodenums. Die daraus resultierende *H. pylori*-induzierte Bulbitis kann Ausgangspunkt für die Entstehung eines Ulcus duodeni sein (GOODWIN, 1988).

1.7.4 *Helicobacter pylori* und Magenkarzinom

Eine entscheidende Bedeutung für die Karzinogenese kommt präkanzerösen Läsionen des Magenepithels zu. Eine Infektion mit *H. pylori* induziert in den meisten Fällen ein chronisch-aktives Entzündungsgeschehen, und infolgedessen entstehen nicht selten Läsionen (CORREA und RUIZ, 1989). Dadurch kommt es häufig zu einer intestinalen Metaplasie mit bevorzugter Lokalisation im Antrum, die Ausgangspunkt für eine maligne Entartung des geschädigten Gewebes sein kann.

Die Induktion einer *H. pylori*-Gastritis und der damit verbundene Umbau der Schleimhaut mit Atrophie und intestinaler Metaplasie bildet den Grundstein einer präkanzerösen Kondition für die Entwicklung eines Karzinoms.

Infolge inflammatorischer Prozesse bei den chronischen Entzündungsvorgängen kann es zur Bildung freier Radikale und zur Proliferation von Zellen kommen (PARSONNET, 1993). All diese Faktoren erhöhen das mutagene Risiko. Kürzlich konnte auch im Tierversuch gezeigt werden, dass durch die Infektion Karzinome induziert werden können (WATANABE et al., 1998).

Physiologischerweise bieten Antioxidantien wie Vitamin C und E einen Schutz vor oxidativen DNA-Mutationen. Bedingt durch *H. pylori*-Infektionen kommt es jedoch zu einer deutlichen Verringerung der Ascorbinsäurekonzentration im Magen, wodurch dieser Abwehrmechanismus gegenüber oxidativen DNA-Schäden geschwächt wird (BANERJEE et al., 1994; SOBALA et al., 1993).

1.7.5 *Helicobacter pylori* und gastrointestinale Lymphome

Die Zellen eines niedrig malignen B-Zell-Lymphoms des Magens ähneln Lymphozyten (mucosa-associated-lymphoid-tissue, M A L T) in der Magenmucosa. Da die Mucosa üblicherweise keine Lymphfollikel enthält, wird das Auftreten von MALT als Folge der Immunantwort auf eine *H. pylori*-Infektion gedeutet. Tatsächlich lässt sich bei über 90 % aller MALT-Lymphome eine Infektion mit *H. pylori* nachweisen. Das Wachstum solcher *H. pylori*-assoziiierter MALT-Lymphome wird offensichtlich durch *Helicobacter*-Antigene stimuliert und durch T-Lymphozyten vermittelt. Erste Studien konnten eine erfolgreiche Regression dieses Lymphomtyps nach erfolgreicher Eradikation des *H. pylori* zeigen (WOTHERSPOON et al., 1993).

H. pylori-Infizierte haben, im Vergleich zu nichtinfizierten Personen, ein 6fach höheres Risiko an einem MALT-Lymphom des Magens zu erkranken (PARSONNET et al., 1994).

Ätiopathogenetisch gesehen spielen hier offensichtlich unterschiedliche *Helicobacter pylori*-Stämme eine Rolle. Auf serologischer Basis konnte E c k (ECK et al., 1997), bei 90 % der Patienten mit niedrig oder hoch malignen MALT-Lymphomen Cag A-positive *H. pylori* nachweisen. Der histologische Erreger-Nachweis war im Vergleich niedriger (78 %). Dies könnte unter anderem auf tumorbedingte Veränderungen des gastralen Mikromilieus mit konsekutivem Rückgang der Besiedlungsdichte zurückzuführen sein. Hierfür spricht auch indirekt die Tatsache, dass von verschiedenen Autoren höhere Infektionsraten bei niedrig malignen Lymphomen, insbesondere in frühen Stadien, im Vergleich zu fortgeschrittenen hoch malignen Lymphomen beschrieben wurden (FISCHBACH, 1999).

1.7.6 *Helicobacter pylori* und funktionelle Dyspepsie

Von einer funktionellen Dyspepsie (Synonyme: "non-ulcer-dyspepsia", "Reizmagen") spricht man, wenn bei Oberbauchbeschwerden keine eng umschriebenen, morphologisch definierbaren Läsionen nachzuweisen sind (BLUM et al., 1995). Klinische Symptome, die am ehesten auf eine Dyspepsie hinweisen: Aufstoßen,

Sodbrennen, retrosternales Druckgefühl, epigastrischer Schmerz, epigastrisches Brennen, Druck-und Völlegefühl, Übelkeit / Erbrechen.

Die Diagnose "funktionelle Dyspepsie" setzt den Ausschluß organischer Erkrankungen voraus (STADELMANN, 1996).

Der bisherige Kenntnisstand weist große Unsicherheiten in der Bewertung eines Zusammenhangs zwischen *H. pylori*-Infektion und Dyspepsie auf. Eine spezifische Symptomatik liegt bei einer Dyspepsie mit gleichzeitiger *H. pylori*-Infektion nicht vor, wenngleich in mehreren Studien der epigastrische Schmerz in der Nüchternphase häufiger beobachtet wurde als bei *H. pylori*-negativen Dyspepsiepatienten. Pathophysiologische Veränderungen im Rahmen der *H. pylori*-positiven Dyspepsie schließen eine leicht gesteigerte Säuresekretion, Veränderungen der interdigestiven Motilität und eine Verlängerung der gastrointestinalen Transitzeit ein. Insgesamt muss hier jedoch festgehalten werden, dass eine Bewertung des pathophysiologischen Zusammenhangs der Infektion mit Verdauungsfunktionen nicht als abgeschlossen gelten (CASPARY, 1996; MOAYYEDI et al., 2000).

1.7.7 Bedeutung von *Helicobacter pylori* bei Dermatosen

In den letzten Jahren wurde in mehreren Arbeiten auf einen Zusammenhang zwischen *Helicobacter pylori* und einer chronisch-rezidivierenden Urtikaria hingewiesen.

Nicht selten werden von Patienten mit chronisch-rezidivierender Urtikaria gleichzeitig gastrointestinale Beschwerden angegeben, wie sie für Gastritis und Refluxösophagitis typisch sind (BOHMEYER et al., 1996; KOLIBASOVA et al., 1994).

Einige Arbeiten wiesen ferner auf einen möglichen Zusammenhang zwischen *Helicobacter pylori* und Rosazea, Sjögren-Syndrom, Raynaud-Syndrom, systemischer Sklerodermie, Purpura Schoenlein-Henoch, Sweet-Syndrom und atopischer Dermatitis hin (TEBBE et al., 1999).

In einer von Rebora et al. (REBORA et al., 1994) publizierte Untersuchung konnte gezeigt werden, dass bei 80% der Rosazea-Patienten eine histologisch gesicherte *Helicobacter pylori*-Infektion des Magens vorlag.

In einer Untersuchung an 69 Patienten mit systemischer Sklerodermie konnte im Vergleich zur nicht betroffenen ein gehäuftes Auftreten (56%) von *H. pylori*-Infektionen serologisch nachgewiesen werden, wobei das Vorhandensein von Anti-*H. pylori*-IgG-Antikörpern bei systemischer Sklerodermie mit einer Ösophagusbeteiligung signifikant korrelierte (YAZAWA et al., 1998).

1.8 Therapiemöglichkeiten bei *Helicobacter pylori* - Infektion

Ziel jeder Therapie ist die vollständige Ausrottung der Bakterien („Eradikation“). Von einer Elimination spricht man dagegen, wenn nach erfolgter Therapie die Keimdicke temporär bis unter die Nachweisbarkeitsgrenze gesunken ist (MORGNER et al., 1997).

Im Jahr 1993 wurde das Konzept der niedrig dosierten Kurzzeit-Tripeltherapie erstmals vorgestellt (BAZZOLI et al., 1994).

Die Eradikation von *H. pylori* ist bei jeder symptomatischen Infektion indiziert (MALFERTHEINER et al., 1997). Zur Anwendung kommen mehrere Therapieschemata, die auf dem Prinzip der Eradikation des Erregers und der Hemmung der Säureproduktion basieren (siehe Tabelle 2). Hierdurch wird eine komplette Remission in maximal 80 - 90% der Fälle erreicht (TOERMER und WOLF, 1997). Bei Verabreichung der Medikamente in niedriger Dosierung und über einen längeren Zeitraum als angegeben erhöhen sich die Kosten um etwa die Hälfte (O'BRIEN et al., 1995). Neben der Kostenfrage stellt jedoch das vermehrte Auftreten antibiotika-resistenter Stämme ein grundsätzliches Problem dar (PEURA, 1998).

Tab. 2: Kurzzeit-Tripel-Therapie (LABENZ et al., 1996)

| | | |
|-------------|----------------|------------------------|
| Tag 1-7 | Omeprazol* | 2 x 20 mg präprandial |
| | Clarithromycin | 2 x 500 mg präprandial |
| | Amoxicillin | 2 x 1 g präprandial |
| <i>oder</i> | | |
| Tag 1-7 | Omeprazol* | 2 x 20 mg präprandial |
| | Clarithromycin | 2 x 250 mg präprandial |
| | Metronidazol | 2 x 400 mg präprandial |

*Nach Richtlinien der deutschen Gesellschaft für Verdauungs-und Stoffwechsel -
krankheiten auch Lansoprazol 2 x 30 mg oder Pantoprazol 2 x 40 mg

Nach erfolgreicher *H. pylori*-Eradikation bleibt auch bei negativem Atemtest die Serologie zunächst positiv (LEHN et al., 1996). Eine Verlaufsbeurteilung ist deshalb erst drei bis sechs Monate nach beendeter Therapie möglich. Ein Eradikationsversagen ist in den meisten Fällen einer mangelnden Compliance des Patienten, meist als Folge aufgetretener Nebenwirkungen, zuzuschreiben. Begünstigt wird hierdurch die Entwicklung einer Antibiotikaresistenz von *H. pylori*, was bei einer Reihe von Patienten weit kompliziertere Therapien notwendig macht (BOCK et al., 1997).

2 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Das Bakterium *Helicobacter pylori* adhäriert an das Epithel der gastrointestinalen Schleimhautbarriere und induziert eine Immunantwort, die sich humoral und zellulär manifestiert. Die humorale Immunreaktion ist systemisch durch erhöhte IgG-Titer nachweisbar. In der Mukosa werden lokal sekretorische antigenspezifische IgA-Antikörper gebildet.

Für die vorliegende Arbeit wurden Methoden der Proteom-Analyse zur Identifizierung von Proteinen des *Helicobacter pylori* eingesetzt. Der Begriff 'Proteomics' oder Proteom-Forschung beschreibt ein neues Gebiet der Biochemie. Er wurde erstmals 1994 auf dem Siena Two Dimensional Electrophoresis Meeting in Italien erwähnt und beschreibt die exprimierten **PROTE**ine eines Gen**OM**s (KAHN, 1995).

Das Proteom beschreibt quantitativ alle exprimierten Proteine einer Zelle oder eines Organs (bei höheren Lebewesen) unter genau definierten Bedingungen (HOUSE et al., 1987) und ist einer Vielzahl interner und externer Faktoren, wie Metabolismus und Umwelteinflüssen, ausgesetzt, die das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese, Modifikation und Degradation unterschiedlich stark beeinflussen können. Dies muss in der Proteom-Forschung berücksichtigt werden, um Veränderungen des Proteinmusters auszuschließen, die nicht auf den Zellzustand zurückzuführen sind (ANDERSON und ANDERSON, 1996).

Durch zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) ist es möglich, mehr als Hälfte aller Proteine eines Zellextrakts aufzutrennen. Auf den Gelen wird das Proteingemisch in der ersten Dimension nach der isoelektrischen Ladung, in der zweiten nach Molekulargewicht aufgetrennt. Bis zu 10 000 Spots sind dann auf einem Gel zu finden. Das jeweilige gewebsspezifische Muster kann gescannt und per Computer mit anderen verglichen werden, etwa mit dem eines kranken Gewebes. Zum Nachweis von

Antikörpern gegen bestimmte, *Helicobacter pylori*-spezifische Antigene dient das sogenannte Immunblotting. Hierzu werden die durch 2-DE aufgetrennten Proteingemische vom Gel auf eine Membran transferiert. Die resultierenden Immunreaktionen beruhen auf dem Prinzip des unten beschriebenen ELISA-Tests.

Ziel der vorliegenden Studie war es, im Rahmen einer Proteomanalyse

1. *Helicobacter pylori*-spezifische Proteine als Hilfsmittel für eine spezifische Diagnose der Serum-Analyse zu nutzen,
2. die unterschiedliche Immunreaktivität von *Helicobacter pylori*-infizierten Patientenseren bei verschiedenen gastrointestinalen Krankheitsmanifestationen (wie Gastritis, Ulcus, Karzinom, Lymphom) zu bestimmen,
3. hoch immunogene Proteine als Vakzine Kandidaten zu ermitteln,
4. die erkannten hochimmunogenen Proteinmuster der einzelnen Patientenseren mit anderen Kriterien der *H. pylori*-Diagnostik (wie Histopathologie, Bakterienkultur, Urease-Schnelltest, ELISA) zu vergleichen.

3 MATERIAL UND METHODEN

Für diese Studie wurden insgesamt 334 Patienten der gastroenterologischen Abteilung des Virchow-Klinikums der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin untersucht, die entweder stationär oder ambulant betreut wurden und bei denen aufgrund von gastroenterologischen Beschwerden oder einer Allgemeinerkrankung eine Endoskopie des Gastrointestinaltraktes durchgeführt wurde. Hierbei wurden Gewebeproben der Schleimhaut entnommen

Bei 12 Patienten erfolgte die Endoskopie nicht im Virchow-Klinikum. Von den 322 im Virchow-Klinikum endoskopierte Patienten wurden acht Patienten zur Verlaufskontrolle nochmals endoskopierte, so dass hier insgesamt 330 Endoskopien durchgeführt wurden.

Wenn die Endoskopie einen auffälligen Befund ergab (wie Verdacht auf Gastritis, Ulkus, Karzinom oder andere Schleimhautveränderungen), wurde eine anamnestiche Befunderhebung durchgeführt, um über die Aufnahme in die Studie zu entscheiden. Die Befunderhebungen wurden durch Histologie, CLO-Test, *H. pylori*-Anzucht und klinische Diagnostik (Ulkus, Gastritis, Lymphom, Karzinom) gestützt.

Nach Endoskopie, Befunderhebung und Bestimmung des Krankheitsbildes wurden 79 Patienten (27 Frauen und 52 Männer) im Alter von 17 bis 77 Jahren (Durchschnittsalter der Frauen 56 Jahre und der Männer 55 Jahre) zur weiteren Untersuchung ausgewählt und in Gruppen je nach Krankheitsbild eingeteilt. Von jedem Patienten wurden, je nach Verfügbarkeit, dessen klinische Parameter und diagnostische Untersuchungsergebnisse (Histologie, Bakterienkultur, CLO und ELISA) dokumentiert. Patienten, die Immunsuppressiva eingenommen hatten, wurden in die Studie nicht eingeschlossen.

Zur Analyse der *Helicobacter*-Proteinmustererkennung durch Serumantikörper wurden an 55 der 79 Patientenserum Immunoblots durchgeführt. Sämtliche Patientendaten sind

mit Serumkürzeln, *H. pylori*-Antikörper-Testergebnissen (ELISA), Ergebnissen der Urease-Schnelltests (CLO) und der Bakterienanzucht aus der Biopsie, *H. pylori*-Anamnese und Zustand nach Eradikation im Anhang in Tabelle 16 zusammengestellt.

Zusätzlich wurden 10 Immunoblots mit gepoolten Seren durchgeführt.

Die 79 Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden, erhielten eine zusätzliche Aufklärung, und gaben eine zweite Einverständniserklärung ab.

3.1 Gastroskopische *Helicobacter pylori* - Diagnostik

Die Biopsieentnahmen für Histologie, CLO-Test sowie Kultur wurden in der Endoskopie-Abteilung der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität, Campus Virchow (Direktor: Prof. Dr. Wiedenmann) durchgeführt. Die Endoskopie wurde bei einem Teil der Patienten auf Wunsch unter Lokalanästhesie des Rachenrings oder unter Sedierung mit 5 mg Midazolam i.v. vorgenommen. Die von unterschiedlichen Ärzten vorgenommene Gastroskopie erfolgte in der Regel in Linksseitenlage des Patienten mit dirigierbaren Gastroskopen der Firma Olympus und der dazugehörigen Biopsiezange. Zur Desinfektion wurde Lysetol FF 2% verwendet.

3.1.1 Nachweis der Ureaseaktivität von *Helicobacter pylori* (CLO - Schnelltest)

Grundlagen: Die H. p.-Urease ist ein oberflächlich assoziiertes, relativ großes Enzym, das aus zwei strukturellen Untereinheiten (Ure A, ca. 28 kDa, und Ure B, ca. 66 kDa) besteht. Sie katalysiert die Spaltung von Harnstoff in Ammoniumionen und Hydrogencarbonat, danach Bildung von Ammoniak und Kohlendioxid. Das bewirkt eine lokale Neutralisierung des sauren pH und erlaubt es dem Bakterium, kurzfristig im sauren Magenumen zu überleben, bevor es in die Bikarbonat-gepufferte Schleimhautschicht der Magenmukosa eindringt (CLAYTON et al., 1990).

Der CLO (Campylobacter like Organisms)-Test ist ein kommerziell erhältlicher Test, dessen Grundprinzip auf der starken Ureasebildung des *Helicobacter pylori* basiert. Ein wesentlicher Bestandteil des CLO-Testes ist ein Agar, der neben Harnstoff und einem pH-abhängigen Farbindikator (Phenolrot) ein Bakteriostatikum enthält, das die Vermehrung anderer, ureasebildender Bakterien effektiv unterdrückt. In dieses

Testmedium wird das zu untersuchende, endoskopisch gewonnene Biopsiepartikel aus der Magenmukosa eingebracht.

Mit diesem Nachweisverfahren wird eine in der zu testenden Probe enthaltene Ureaseaktivität qualitativ erfaßt. Das Prinzip des Tests ist die Spaltung der in dem Testmedium vorhandenen Urease (KOLTS et al.,1993). Der mit der Abspaltung von Ammoniak verbundene Anstieg des pH-Wertes bewirkt einen Farbumschlag des Indikators (Phenolrot) von gelb nach rosa.

Material: Gewebeproben

Testmedium der Firma Procter und Gamble Pharmaceuticals

Durchführung des Tests: Bereits während der Gastroskopie wurden die aus dem praepylorischen Antrum und aus dem Corpus entnommenen Gewebeproben in das Testmedium gegeben. Das nur kurz geöffnete Reaktionsgefäß wurde nach Einführung der Gewebeproben sofort wieder verschlossen und bei Raumtemperatur trocken gelagert. Eine rosa oder rote Verfärbung des Testmediums zeigt eine positive Reaktion und damit die Anwesenheit von *Helicobacter pylori* an. In den meisten Fällen einer *Helicobacter pylori*-Infektion ist der Farbumschlag innerhalb von 30 Minuten zu erkennen. Bei Vorliegen einer nur geringfügigen Besiedlung trat ein verzögerter Farbumschlag ein. Farbumschläge, die nach Ablauf von 24 Stunden eintraten, galten als negative Reaktion.

3.1.2 Histologischer Nachweis von *Helicobacter pylori*

Für den histologischen Nachweis wurden Biopsien aus Bereichen eng umschriebener Rötungen, Erosionen, Ulzera oder anderer morphologischer Veränderungen entnommen. Die Klassifikation erfolgte nach dem Sydney-System.

Für den direkten Nachweis einer zum Zeitpunkt der Untersuchung bestehenden *H. pylori*-Infektion wurden pro Patient insgesamt zwei Magenbiopsien aus Magenkorpus und -antrum, gegebenenfalls aus dem Ulkusrand, mikrobiologisch und histologisch auf *H. pylori* untersucht. Auch bei Verdacht auf Ösophagusveränderungen wurden von entsprechenden Stellen Biopsien entnommen. Bei einigen Patienten ist auch die

Duodenalschleimhaut untersucht worden. Eine histologische Begutachtung der Magenschleimhautbiopsien liegt für die meisten Patienten vor.

Die Biopsien wurden in 10%igem Formalin konserviert und zur histologischen *H. pylori*-Routine-und Gastritisdiagnostik versandt.

3.1.3 Nachweis von *Helicobacter pylori* auf Kultur

Als "Goldstandard" hat der kulturelle Nachweis aus den Biopsien zu gelten, der bei einem lege artis gesicherten positiven Befund keinem Zweifel unterliegt. Negative Befunde können jedoch neben richtig negativen auch falsch negative oder biologisch richtig, klinisch aber falsch negative Ergebnisse beinhalten (BÖRSCH, 1988), so dass zumindest wissenschaftlich ein negatives Kulturergebnis durch eine vom Prinzip her nicht fokale Nachweismethode, und zwar den Harnstoff-Atemtest, als "negativer Goldstandard" überprüft werden sollten (BÖRSCH et al., 1989).

Der Transport der Biopsien für die mikrobiologische Anzucht betrug weniger als zwei Stunden und erfolgte in Thioglykolat-Bouillon, die in Kunststoff-Bouillon, in Kunststoff-Schraubröhrchen vom Labor der Mikrobiologischen Abteilung, Campus Virchow zur Verfügung gestellt wurde (Direktor: Prof. Dr. Dr. U. Göbel). Dort erfolgte auch die Anzucht. Die Wachstumszeit der Agarkulturen betrug 5 Tage bei 37°C unter mikroaeroben Bedingungen.

3.2 Serumdiagnostik nach ELISA

Nach gesicherter gastrokopischer Diagnosestellung entsprechend den in Kapiteln 3.1 bis 3.3 dargestellten Verfahren, und nach Zuordnung der einzelnen Patienten zu *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen (s. Kap. 1.7) folgte die Durchführung der eigentlichen Aufgabenstellung dieser Arbeit.

Da sich Antikörper mit hoher Spezifität an bestimmte Zielstrukturen (Antigene) binden, sind Testverfahren entwickelt worden, die ausschließlich auf dem Nachweis spezifischer Antikörper-Antigen-Komplexe basieren. Um festzustellen, ob ein Antikörper an sein

Zielantigen gebunden hat, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eines dieser Verfahren ist der enzymgekoppelte Immunnachweis (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (GLICK / PASTERNA, 1994), der in der vorliegenden Studie angewandt wurde.

Wegen der bei *H. pylori*-Infektionen häufiger beobachteten unabhängigen Kinetik der IgG- und IgA-Antikörper ist es sinnvoll, jede erstmalig untersuchte Probe parallel auf beide Antikörperklassen zu testen. Dies empfiehlt sich insbesondere auch für Titerverlaufsuntersuchungen nach erfolgter Antibiotika-Therapie.

In der Protokollführung der vorliegenden Studie wurden die einzelnen Schritte des ELISA-Testverfahrens wie folgt dokumentiert:

1. Serumprobe, die ein spezifisches Molekül oder einen bestimmten Erreger enthalten sollen, wurden an einen festen Träger gebunden, meist auf einer Mikrotiterplatte aus Kunststoff mit 96 Vertiefungen.
2. Ein markerspezifischer Antikörper (der primäre Antikörper) wurde auf das gebundene Material gegeben. Ungebundene primäre Antikörper wurden anschließend durch Waschen entfernt.
3. Zugabe eines zweiten Antikörpers (sekundärer Antikörper), der an den primären Antikörper spezifisch bindet, aber **nicht** an das Zielmolekül. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt (beispielsweise alkalischer Phosphatase, Peroxidase oder Urease), das die Umwandlung eines farblosen Substrats in ein farbiges Produkt katalysiert. Ungebundene sekundäre Antikörper wurden ebenfalls durch Waschen entfernt.
4. Zugabe des farblosen Substrats.

3.2.1 Serumproben

Für die Untersuchung geeignet waren nach Standard-Labortechniken (EDTA, Citrat, Heparin) entnommene Serum-und Plasmaproben.

3.2.2 Material und Geräte

Enzygnost Anti-*H. pylori* 2 / IgG Testplatte (Mikrotitrationsplatte, BEHRING).

- Anti-*H. pylori*-Referenz (flüssig): Humanserum mit spezifischen Antikörpern gegen *H. pylori*
- Anti-*H. pylori*-Referenz (flüssig): Humanserum ohne Antikörper gegen *H. pylori*-Antigene
- Coating-Puffer: PBS (phosphate buffered saline)
- Waschpuffer: PBS + 0,1% BSA (bovine serum albumin) + 0,05% Tween20
- Blocking-Puffer: PBS + 1% BSA
- Detection-Puffer: PBS + 0,1%BSA
- Substrat-Puffer: Diethanolaminpuffer pH 9,8
- Stopplösung: 0,5 M EDTA pH 8,0

3.2.3 Ablaufschema der serologischen Identifikationen

Die immunologische Bestimmung der Serumproben erforderte jeweils zwei Tage. Alle ELISA-Untersuchungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

1.Tag:

1. AK wurde in Coating-Puffer verdünnt: 5 µl AK in 5 ml Coating-Puffer, dann erfolgte Coaten der Platte (50 µl / well) mit anschließender Inkubation 1 h bei 37°C im Brutschrank (feuchte Kammer).
2. Die Platte wurde 4x mit Waschpuffer gewaschen (dann mehrmals ausgeklopft).

3. Blocken der Platte: 100 µl / well, anschließend 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
4. 4x Waschen der Platte mit Wasch-Puffer (dann mehrmals ausgeklopft).
5. Verdünnte Probe (2,5 µl AK in 2,5 ml PBS) wurde auf die Platte aufgetragen (100 µl/well) und inkubiert; über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.

2.Tag:

1. Die Platte wurde 4x mit Wasch-Puffer gewaschen.
2. Verdünnung des 2. AK in PBS 1: 3000 und Auftragen auf die Platte (100 µl / well).
3. Inkubation 1 h bei 37°C im Brutschrank (feuchte Kammer).
4. 4x Waschen der Platte.
5. Auftragung der verdünnten (1 : 1000) Strept.-Alkalische Phosphatase (100 µl / well) und anschließend Inkubation 1 h bei 37°C im Brutschrank (feuchte Kammer).
6. Nach 4x Waschen der Platte folgte die Auftragung der Substrat-Lösung (Diethanolaminpuffer pH 9, 8): 50 µl / well.
7. Inkubation: 1 h im Dunkeln bei RT.
8. Auftragung der Stopplösung: 50 µl / well.
9. Messen bei 450 nm.

3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese und Western - Blotting

3.3.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zewidimensionale Gelelektrophorese ist eine speziell entwickelte Methode der Gelelektrophorese, bei der sehr komplexe Proteingemische in zwei Dimensionen nach jeweils anderen Kriterien aufgetrennt werden. In der ersten Dimension erfolgt in Gelröhrchen eine isoelektrische Fokussierung in Harnstoff unter Ausnutzung der Ladungsdifferenzen. Aminosäuren, die Grundbestandteile der Proteine, tragen mindestens eine Amino-sowie eine Säuregruppe. Die erstere ist bei neutralem pH-Wert positiv, die letztere negativ geladen. Da Proteine aus Aminosäuren aufgebaut sind,

besitzen auch sie eine bestimmte Ladung. Verändert sich der pH-Wert der Lösung, in der sich das Protein befindet, ändert sich auch die Nettoladung des Moleküls. Der Punkt, an dem sich die positiven und die negativen Ladungen des Proteins gerade aufheben und es nach außen hin ungeladen erscheint, wird isoelektrischer Punkt (IEP) genannt. Die Proteine sowie deren Fragmente wandern innerhalb des Gels unter der Wirkung eines elektrischen Feldes in Abhängigkeit von Ladungsanzahl und Molekülmasse unterschiedlich schnell zu den jeweiligen Polen. In der zweiten, zur ersten Dimension quer in der Gelplatte verlaufenden Trennung erfolgt eine Separation nach den Molmassen der Einzelproteine. Dabei wird der Gelstreifen auf ein *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)-Gel transferiert und dann eine SDS-PAGE (*Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese*) durchgeführt (ANDERSON et al., 1984).

Die Bindung von SDS an Proteine verhält sich proportional zu deren Molekulargewicht. Die negative Ladung des gebundenen Detergens überwiegt gegenüber der intrinsischen Ladung des Proteins (ABBAS et al., 1996). Das gebundene Dodecylsulfat bewirkt darüber hinaus auch eine Entfaltung des Proteins. Nach Auftrennung sämtlicher Disulfidbindungen, die die einzelnen Polypeptidketten verbinden, entstehen semirigide lineare Gebilde, deren Länge proportional zum Molekulargewicht ist. Die Größe eines unbekannten Proteins kann ermittelt werden, indem die Wanderungsdistanz in SDS-PAGE mit derjenigen bekannter, parallel zur Probe angeordneter Standardpräparate verglichen wird. Mit dieser Methode kann die Größe jedes Proteins zwischen etwa 5 000 und 250 000 Dalton oder höher genau bestimmt werden (ABBAS et al., 1996).

Nach der Auftrennung wird die Position der Proteine im Gel durch Färbung ermittelt. Gebräuchliche Methoden sind die Fixierung der Proteine durch denaturierende Lösungsmittel und anschließende Anfärbung mit Proteinfarbstoffen wie Coomassie-Blau oder Verwendung der fixierten Proteine als Kristallisationspunkt einer in situ-Reduktion von Silbermolekülen ("Silberfärbung"). Anschließend werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine vom Gel auf eine Membran transferiert, auf der sie mit immunochemischen Methoden angefärbt werden ("Westernblotting").

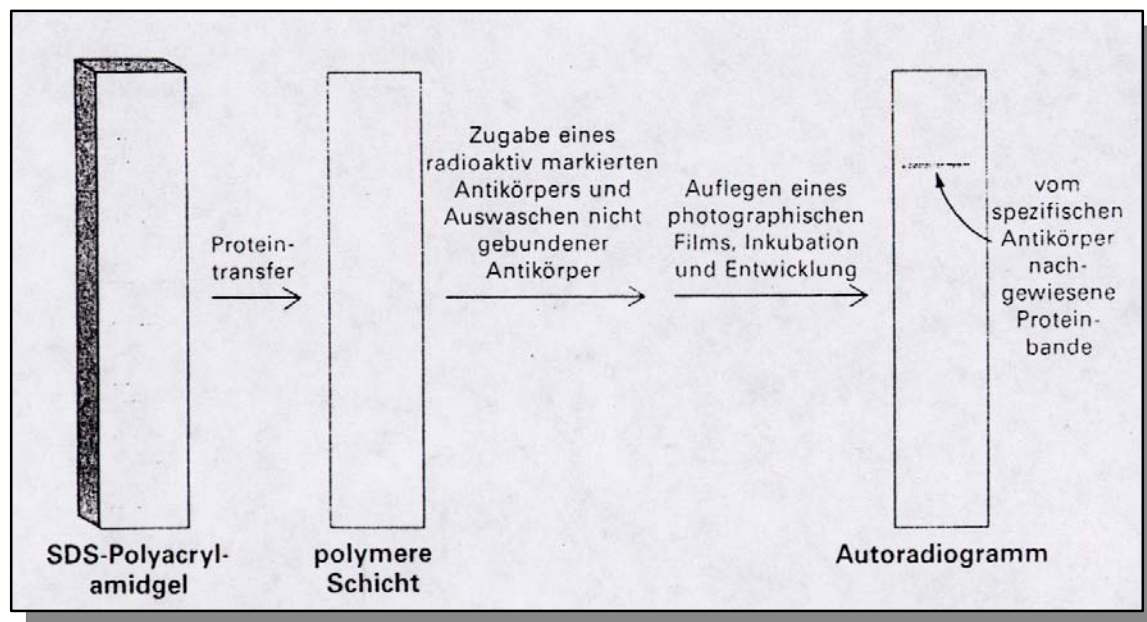


Abbildung 2: Nachweis eines Proteins auf einem Gel durch Western-Blotting. Die auf einem SDS-Polyacrylamidgel getrennte Proteine werden auf eine polymere Schicht übertragen und mit einem radioaktiven Antikörper gekennzeichnet. Auf dem Autoradiogramm erscheint dann eine Bande, die dem gesuchten Protein entspricht.

3.3.1.1 Herstellung der bei der 2D - Elektrophorese verwendeten Lösungen

(JUNGBLUT et al.,1997)

1. Dimension

- 1.) Ammoniumpersulfatlösung 0,8%ig
 - Einwiegen von 0,8 g Ammoniumpersulfat
 - Auffüllen auf 100 ml mit Aqua deion.
 - Aliquotieren zu je 60 µl

- 2.) WITA-IEF-Separationsgellösung
 - kurz vor Gebrauch 1365 g Separationsgellösung mit 35 µl Ammoniumpersulfatlösung 0,8%ig versetzen und mischen

3.) WITA-IEF-Cappellösung

- kurz vor Gebrauch 390 µl Cappellösung mit 10 µl 0,8%iger Ammoniumpersulfatlösung versetzen und mischen

4.) Anodenlösung

→ wird frisch angesetzt:

- Abwiegen von 54 g Harnstoff
- im Messzylinder mit Aqua. deion. auffüllen auf 285 ml
- in ein Becherglas umfüllen und mittels Magnetrührer lösen
- Becherglas mit Parafilm verschließen
- unmittelbar vor Gebrauch 15 ml 85%ige (m/v) Phosphorsäure dazugeben und mittels Magnetrührer mischen

5.) Kathodenlösung

→ wird frisch angesetzt:

- Einwiegen von 135 g Harnstoff und 12,5 g Glycerin
- Auffüllen mit deionisiertem Wasser auf 237,5 ml
- im Becherglas unter Rühren (Magnetrührer) erhitzen auf maximal 40°C, bis sich der Harnstoff und das Glycerin gelöst haben
- Zugabe von 12,5 ml Ethylendiamin unmittelbar vor Gebrauch, mischen mit Magnetrührer

6.) Überschichtungslösung

- Abwiegen von 6 g Harnstoff und 1 g Glycerin
- Auffüllen auf 19 ml mit Aqua.deion
- von dieser Stammlösung 3,8 ml abnehmen und mit 0,2 ml Servalyt 2 - 4 versetzen
- Aliquotieren zu je 200 µl

7.) Unterschichtungslösung

- Abwiegen von 10,8 g Harnstoff
- Auffüllen mit 40% (m/v) Glycerin auf 20 ml
- Aufbewahrung erfolgt bei Raumtemperatur

8.) WITA-Sephadex-Gellösung

- vor Gebrauch werden die 100 mg WITA-Sephadex-Gellösung mit 108 mg Harnstoff und 10,0 µl Ampholytmix (pl 2 - 11) versetzt und auf dem Vortex 15 Minuten gründlich geschüttelt

9.) Inkubationslösung

2. Puffer:

- 12,11 g Tris-Base wird eingewogen und mit deionisiertem Wasser auf 35 ml aufgefüllt
- pH-Wert wird mit 1 M Phosphorsäure 6,8 eingestellt
- mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt

3. Lösung:

- zu 50 ml Puffer werden 160 g Glycerin und 12 g SDS hinzugefügt und mit deionisiertem Wasser auf 400 ml aufgefüllt
- vor dem Gebrauch wird zu je 20 ml 0,2 g DDT hinzugefügt und gelöst

2. Dimension

1.) Ammoniumpersulfatlösung 1,28%ig (nur für WITA-Fertiggellösungen)

- 1,28 g Ammoniumpersulfat wird abgewogen und aufgefüllt auf 100 ml mit deionisiertem Wasser
- Aliquotieren zu je 1,2 ml

2.) Agarose

- 1,25 ml Inkubationspuffer wird abgemessen, dazu wird 8,7 ml 0,115% (m/v) SDS zugegeben
- 0,1 g Agarose wird hinzugefügt und bei 70 °C gelöst. Das wird vor Gebrauch bei einer Temperatur von 40°C gehalten

3.) WITA-SDS-PAGE-Gellösung

- vor Gebrauch wird 1,2 ml Ammoniumpersulfatlösung 1,28%ig zu je 18 ml WITA-SDS-PAGE Gellösung zugefügt

4.) Laufpuffer für die 2.Dimension wird frisch angesetzt:

- 2,422 g Tris-Base, 11,52 g Glycin und 0,8 g SDS werden abgewogen, aufgefüllt mit deionisiertem Wasser auf 800 ml aufgefüllt und in einem Messzylinder mit dem Magnetrührer gelöst

5.) Fixierlösung

1. Abgemessen: 500 ml Methanol/Ethanol
 100 ml Essigsäure
 400 ml deionisiertem Wasser

3.3.1.2 Durchführung der 2D - Elektrophorese

(JUNGBLUT et al., 1997; KLOSE, J., 1975)

1. Dimension

1.) Vorbereitung der Gelröhrchen:

Material / Geräte: [vorher zurechtgelegt für einen Ansatz (8 Glasröhrchen)]

- Gießvorrichtung und Vorratswanne für Gellösungen
- 97 µl Separationsgellösung
- 975 µl Capgellösung
- 25 µl 0,8%ige Ammoniumpersulfatlösung
- 2 Tuberkulinspritzen / 2 Hero-Injektionsnadeln
- 2 Gilson-Pipetten (0 - 2 µl und 0 - 200 µl)
- 8 Polypropylen (PP)-Fäden mit 1,5 mm Durchmesser
- Glasröhrchen für Gele
- Pumpe zur Entgasung der Gellösung / Anschlussstücke

Die Glasröhrchen wurden 25 mm vom oberen Rand mit einer zusätzlichen Hilfsmarkierung versehen. Die Glasröhrchen wurden mit dem Capgelende nach unten in die Gießvorrichtung eingespannt, so dass sie knapp oberhalb der Vorratswanne standen. PP-Fäden wurden vom oberen Ende bis zum unteren Ende durchgeschoben. Die Separationsgellösung und die Ammoniumgellösung wurden aufgetaut und die Separationsgellösung 5 Minuten lang entgast. Die Ammoniumsulfatlösung wurde zu den Capgel zugegeben. Diese wurde in die Vorratswanne eingefüllt, so dass die Enden aller Glasröhrchen in die Gellösung eintauchten. Die Gellösung wurde durch vorsichtiges Hochziehen der PP-Fäden bis zur 25 mm Markierung gezogen, dann die Gelvorratswanne entfernt und die Gellösung bis zur 13mm - Markierung hochgezogen.

Nach 30minütiger Polymerisationszeit wurden die PP-Fäden herausgezogen, das Polymerisationswasser entfernt, eine Feuchtkammer angelegt. Hierzu wurde das Wasser oberhalb des Gels mit einer ausgezogenen Pasteurpipette vorsichtig abgezogen. Durch Aufbringen eines großen Tropfens Aqua deion. auf die Kapillaröffnung bildete sich ein Luftpolster zwischen dem Gel und dem Wassertropfen. Die so entstandene Feuchtkammer wurde mit Parafilm fest verschlossen und Röhrchen im Gießstand umgedreht, so dass die Cappel-Seite nach oben zeigte. Die Cappelösung wurde aufgetaut und anschließend entgast. Zur Cappelösung wurde 10 µl 0,8%iger Ammoniumpersulfatlösung zugegeben. Dann erfolgte das Einfüllen der Cappelösung. Nach luftblasenfreier Überschichtung mit ca. 2 mm deionisiertem Wasser wurden die Röhrchen nach 15 Minuten mit Parafilm verschlossen und eingefroren.

2.) Probenauftrag:

Material / Geräte: - Anoden- und Kathodenlösungen

- vorbereitete Probe (*H. p.-Stamm*: PA 4)
- Sephadex-Lösung
- Harnstoff
- Ampholytmix
- 5 µl Überschichtungslösung
- deionisiertes Wasser
- ausgezogene Pasteurpipetten
- 2 Gilson-Pipetten (0 - 20 µl und 0 - 200 µl)
- Multiflexspritzen
- Fokussierungskammer

Eine mit Ethylendiamin frisch versetzte Kathodenlösung wurde in die untere Fokussierungskammer eingefüllt. Nach dem Auftauen der Sephadex-Lösung wurden 54 mg Harnstoff und 5 µl Ampholytmix zu 50 mg Sephadex-Gel gegeben und auf dem Vortex 15 Minuten kräftig geschüttelt. Die Glasröhrchen wurden mit der Cappel-seite nach oben, in den Anodenteil der Kammer eingespannt, der Parafilm entfernt und die Kapillarröhrchen am Cappelende mit Kathodenlösung luftblasenfrei aufgefüllt, nachdem zuvor das Wasser entfernt worden war. Der Anodenteil wurde auf den unteren Teil der Fokussierungskammer eingesetzt, wobei die Röhrchen mit der Cappel-seite in die

Kathodenlösung eintauchen mussten. Der Parafilm und das Wasser wurden entfernt, anschließend die Auftragsseite (eine Markierung) mit Filterpapierstreifen getrocknet. Die vorbereitete Probe und die Übersichtungslösung wurden aufgetaut. Nach Übersichten des Gels mit 2 mm geschütteltem Sephadex wurde die Probe luftblasenfrei aufgetragen. Die Übersichtungslösung wurde mit Multiflexspritzen vorsichtig auf die Probe aufgetragen, anschließend die Kapillaren luftblasenfrei mit Anodenlösung aufgefüllt.

3.) Lauf der 1. Dimension:

Materialien: - Power Supply (Spannungsbereich bis 1000 V)

Die Spannung wurde stufenweise erhöht: 100 V (60 Minute), 200 V (60 Minuten), 400 V (60 Minuten), 600 V (60 Minuten), 800 V (10 Minuten), 1000 V (5 Minuten).

4.) Inkubation der Gele und Vorbereitung für die 2. Dimension

Materialien:

- Inkubationslösung
- 87%iges Glycerin
- Aqua deion.
- kleine Petrischalen (Durchmesser: 5 cm)
- 5 ml - Glaspipette mit Peleusball
- Polypropylen(PP)-Fäden (Durchmesser: 1,5 mm)

Die Inkubationslösung wurde aufgetaut und 0,4 g DDT dazu gegeben. Nach Beendigung des Laufes der 1. Dimension wurde die Kathoden- und die Anodenlösung aus den Röhrchen entfernt und die Capgelseite mit 87%igem Glycerin aufgefüllt. Danach erfolgte das Einfüllen von jeweils 5 ml Inkubationslösung in die Petrischalen. Die Gele wurden mit PP-Fäden ausgestoßen. Nach genau 10minütiger Inkubation der Gele unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur, wurde die Inkubationslösung abgegossen und die Gele in den Petrischalen bei -70°C aufbewahrt.

2. Dimension

1.) Vorbereitung der Gele

Materialien für zwei Kleingele: - 70%(v/v) Ethanol

- deionisiertes Wasser / Kimwipes
- 2 kleine und 2 große Glasplatten
- vier Spacer (1,5 mm Dicke) / 2 Sandwich-Gestelle
- 1 Gießstand mit Gummidichtung am unteren Ende
- BioRad-Kammer für Kleingele inkl. Halterung mit Netzanschluss und Deckel
- Agarose-Lösung / 18 ml Gellösung
- 1,2 ml 1,28%iges Ammoniumpersulfat

Die Agarose-Lösung wurde auf 70°C zur Verflüssigung erhitzt. Dann erfolgte das Abkühlen der Agarose auf 40°C, um eine Verfestigung zu vermeiden. Die Glasplatten und Spacer wurden mit 70%igem Ethanol gereinigt. Die Gellösung und das Ammoniumpersulfat wurden aufgetaut. Dann wurden die Platten in das Sandwich-Gestell eingespannt. Auf der kleineren Glasplatte wurde 6,9 cm vom Boden aus eine Markierung als Gießhilfe angebracht. Das Sandwich-Gestell wurde in den Gießstand eingespannt. 18 ml Gellösung wurden mit 1,2 ml Ammoniumpersulfatlösung so vermengt, dass sich kein Schaum bildete. Das Gel wurde gegossen (das Töpfchen mit der Gellösung wurde so an die hintere Glasplatte über der Einfüllöffnung angelegt, dass das Gel luftblasenfrei am Glas entlang in die Tasche laufen konnte. Aufgefüllt wurde bis zur Markierung). Nach dem Einfüllen der Gellösung wurde diese zur Glättung der Oberfläche und Förderung der Polymerisation mit deionisiertem Wasser überschichtet. Die Gele waren nach 60 Minuten für den Lauf der 2.Dimension bereit.

2.) Probenauftrag

Material / Geräte:

- Filterpapier
- Agarose-Lösung (40°C warm)
- schmaler Spatel
- Sandwich-Gestelle

- Gele der 1.Dimension
- Laufpuffer (800 ml)

Die Geloberfläche wurde mit Filterpapier vom deionisierten Wasser befreit. Die Sandwich-Gestelle wurden in die Halterung mit Netzanschluß eingespannt. (Die Schrauben zeigten dabei nach außen, die "Hörnchen" nach oben). Die Rundgele wurden auf die Geloberfläche aufgebracht: Dazu wurde das Rundgel aus der Inkubationslösung der Länge nach auf den Rand der dicken Plexiglasplatte gelegt. Dabei war darauf zu achten, dass das Rundgel möglichst nah am Rand der Einfülltasche lag. Das Rundgel ließ sich mit dem Spatel von einem Ende aus vorsichtig in die Einfülltasche gleiten. Anschließend wurde die 40°C warme Agarose mit einer Pasteur-Pipette bis zum oberen Rand der kleineren Glasplatte in die Einfülltasche luftblasenfrei gefüllt. Nach zwei Minuten war die Agarose fest. Nach Einsetzen der Halterung mit den Sandwich-Gestellen wurden außen 620 ml Luftpuffer eingefüllt, wobei Schaumbildung und Luftblasen zu vermeiden waren. In die innere Kammer wurde so viel Puffer eingefüllt, dass der rote Punkt leicht in den Puffer eintauchte.

3.) Lauf der 2.Dimension

Material / Geräte:

- Power Supply (Arbeiten im High Range Bereich)
- Fixierlösung

Die Spannung wurde entsprechend folgender Tabelle stufenweise erhöht:

| Spannung (vorgegeben) | Zeit (Min.) | zwei Kammern parallel (Stromstärke zur Kontrolle) |
|--------------------------|----------------|--|
| 35 V | 5 | 44-42 mA |
| 55 V | 10 | 66-64 mA |
| 100 V | 15 | 118-96 mA |
| 150 V | 60 | 144-100 mA |

Nach dem Lauf wurden der Puffer abgegossen und die Sandwich-Gestelle aus der Halterung genommen. Die Gele konnten nun in die Fixierlösung überführt werden. Dazu wurden Handschuhe benutzt, die vorher unter Wasser abgespült wurden, um eventuell anhaftendes Talkum zu entfernen. Als Fixierlösungen dienten Mischungen aus 50% Methanol, 10% Essigsäure und 40% Wasser. Nach der Fixierung konnte die Färbung erfolgen.

3.3.2 Blotten („Westernblot“)

Theoretisches:

Beim *Immunoblotting* auch *Western-Blotting* handelt es sich um ein sehr empfindliches und spezifisches Verfahren zum Protein-Nachweis. Es verbindet die hohe Trennschärfe der Gel-Elektrophorese mit der Spezifität der Antikörper-Erkennung und der Empfindlichkeit von Enzym-Assays (LODISH et al., 1996). Das heißt, nach Trennung der Proteinantigene mit Zweidimensionaler-Gelelektrophorese (SDS-Elektrophorese) werden die getrennten Substanzen auf eine Nitrozellulose-Membran überführt (Transfer). Die Identifizierung der aufgetrennten Proteine erfolgt durch Serumantikörper und anschließend mit Enzym-markierten Antikörpern. Dadurch werden die Antigene sichtbar gemacht: Der Antikörper (Ak 1) bindet spezifisch an der Stelle des fixierten Antigens. Im letzten Schritt wird die Membran mit einem zweiten, enzymmarkierten Antikörper (Ak 2) inkubiert, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet, durch dessen Enzymanteil die Position auf der Membran mit Hilfe einer chromogenen Reaktion sichtbar gemacht werden kann (Entwicklung).

3.3.2.1 Durchführung

(ECKERSKORN et al., 1988)

Material / Lösungen:

- Blotting-Semi-dry-Kammer (Sartoblot 2, Sartorius)+
- Filterpapier (Schleicher und Schüll, 426 892 GB 003)
- PVDF-Membran: Immobilon-P (Millipore)
- SDF: Glassybond (Biometra)
- Gele: 1,5 mm 2-DE-Gele

- Deionisiertes Wasser, Schere, Handschuhe, Glasstab, Pipette
- Schalen
- Methanol (Merck)
- Blotpuffer: 3,09 g Borsäure (Merck p.a) + 750 ml deionisiertes Wasser + 200 ml Methanol + 18,6 ml 1 NaOH (mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt)
- PBS-Tween

Ablaufschema beim Immunoblot:

1. Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel.
2. Übertragung der aufgetrennten Protein auf Nitro-zellulose-Membran. Danach wurde die Membran 25 Sekunden in Methanol gewaschen, anschließend 5 Minuten im Blotpuffer geschwenkt.
3. Die Membran wurde mit geeigneten Verdünnungen der Antiseren (Ak 1) in Blockierungslösung unter Schütteln inkubiert (1 Stunde, RT) und zum Entfernen der überschüssigen Antikörper anschließend mit PBS-Tween 5mal 20 Min. gewaschen.
4. Nach der Inkubation der Membran mit dem zweiten Antikörper (Ak 2), erfolgte das Waschen der Membran.
6. Der Immunoblot wurde durch Zugabe von 100 ml Substratpuffer entwickelt und anschließend luft-getrocknet.

3.4 Färbeverfahren

3.4.1 Gelfärbeverfahren

3.4.1.1 Coomassie Brilliant Blue - Färbung

Material:

- Coomassie Brilliant Blue R 250
- Ethanol: vergällt mit 1% Methylethylketon

- Methanol: Merck 6009
- HAc: Merck 63

Lösungen: (für 2 KGT-Gele)

- Fixierungslösung: 250 ml Ethanol + 50 ml HAc + 200 ml deionisiertes Wasser
- Färbelösung: 250 ml Methanol + 50 ml HAc + 200 ml deionisiertes Wasser + 0,25 g Serva Blue R-250
- Entfärbelösung: 25 ml Methanol + 62,5 ml HAc + 412,5 ml deionisiertes Wasser
- Aufbewahrungslösung: HAc + 1860 ml deionisiertes Wasser

Die Gele wurden über Nacht in der Fixierungslösung vorsichtig geschwenkt. Zur Färbung wurden sie unter leichtem Schütteln für 1 h mit der Färbelösung behandelt. Um überschüssige Farbe zu entfernen, wurden die Gele in der Entfärbelösung unter leichtem Schwenken für 1 h gewaschen. Die weitere Entfärbung wurde mit der Aufbewahrungslösung für 4 h durchgeführt. In der ersten Stunde wurde die Lösung zweimal gewechselt, danach jede Stunde einmal.

Die Aufbewahrung von eingeschweißten Gelen erfolgte bei 4° C in Aufbewahrungslösung (ECKERSKORN et al., 1988).

3.4.1.2 Silberfärbung

(HEUKESHOVEN et al., 1985)

Material:

- EDTA (Titriplex 3) p.a., Merck 8418
- Ethanol p.a., Merck 983
- Formaldehyd 35% reinst, Merck 4001
- Glutaraldehyd für die Elektronenmikroskopie 25%, Merck 4239
- HAc p.a., Merck 63
- Natriumacetat p.a., Merck 6268
- Natriumcarbonat p.a., Merck 6392

- Natriumthiosulfat p.a., Merck 6516
- Silbernitrat p.a., Merck 1512
- Thiomersal, Sigma T 5125

Lösungen:

- Fixierungslösung: 1000 ml Ethanol + 200 ml HAc + 800 ml deionisiertes Wasser
- Inkubationslösung (frisch): 300 ml Ethanol + 41,09 g Natriumacetat + 20 ml 25%iges Glutaraldehyd + 2 g Natriumthiosulfat. Auf 1000 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.
- Silberlösung (frisch): 1 g Silbernitrat wurde auf 1000 ml aufgefüllt. 288 µl 35%iges Formaldehyd wurden dazugegeben.
- Entwicklungslösung (frisch): 25 g Natriumcarbonat (wasserfrei) und 12 mg Natriumthiosulfat wurden mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Dazu wurde 288 µl 35%iges Formaldehyd gegeben und der pH-Wert auf mit rund 400 mg Natriumhydrogencarbonat auf 11, 3 eingestellt.
- Stopplösung (frisch): 18,612 g EDTA wurde mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und 200 mg Thiomersal dazugegeben.

Die Gele wurden über Nacht in der Fixierlösung geschüttelt. Nach leichtem Schwenken (2h) der Gele in der Inkubationslösung wurden sie 3x je 20 Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen. Die Färbung der Gele erfolgte unter leichtem Schütteln in der Silberlösung über 30 Minuten. Anschließend wurden die Gele mit deionisiertem Wasser 2,5 Min. lang abgespült. Schließlich erfolgte die Entwicklung der Gele unter leichtem Schütteln in der Entwicklungslösung über 5 Min. Nach Erreichen der gewünschter Farbeintensität wurden die Gele 15 Min. in die Stopp-Lösung überführt.

3.5 Auswertung von zweidimensionalen Gelen und Blots

Um die analytischen 2-DE-Gele auswerten zu können, wurden sie unmittelbar nach der Silberfärbung eingescannt.

Zur Identifizierung von Proteinen wurde ein Internet-basiertes Programm verwendet, das auf eine Proteindatenbank zugreift.

Das Programm identifiziert Proteine an Hand ihrer 'peptide mass fingerprint'-Spektren nach proteolytischer Spaltung und Massenspektrometrie.

Zur Datenbanksuche wurde neben Peptidmassen und Sequenzinformationen ein molekularer Massenbereich von 10-100 kDa und ein pI-Bereich von 3-4 für die untersuchten Proteine verwendet.

4 STATISTISCHE METHODEN

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte in der Abteilung Biometrie des Universitätsklinikums Charité der Humboldt-Universität zu Berlin. Die Patientendaten wurden EDV-gerecht erfaßt und mit dem Programmsystem SPSS bearbeitet.

Zur Signifikanztestung erfolgte der Vergleich prozentualer Häufigkeiten mit Hilfe von Chi²- und Kruskal-Wallis-Tests. Für alle Berechnungen wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit p mit $p < 0,005$ festgelegt.

5 ERGEBNISSE

Der Bezugszeitraum für die Endoskopien war Dezember 1997 bis August 1999. Die Untersuchung des Patientenmaterials (Histopathologie, Bakterienkultur, ELISA, Immunoblots) fand im Zeitraum von Dezember 1997 bis August 2000 im Campus Virchow der Charité der Humboldt Universität zu Berlin und im Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Abteilung Molekulare Biologie statt. Insgesamt wurden 334 Patienten, bei denen eine Gastroskopie durchgeführt wurde, untersucht.

Nach Begutachtung der Diagnosestellung nach Histologie, CLO und/oder *H. pylori*-Anzucht wurden 79 Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern ausgewählt (entweder Gastritis, Magenulkus, Duodenalulkus oder Magenkarzinom, außerdem Patienten mit Dysplasie, Metaplasie, Hyperplasie und Polypen), die nach Diagnosestellung geeignet waren und sich für eine weitreichende Anamnese sowie für weitere Untersuchungen bereit fanden.

Von jedem Patienten wurde eine Anamnese seiner aktuellen Beschwerden erhoben. Erfragt wurden Beschwerden wie Nüchternschmerz, Erbrechen, Völlegefühl, Schmerzen im Epigastrium oder retrosternal, auch in Abhängigkeit von der Körperlage, Obstipation, Diarrhoe und Flatulenz. Ebenso wurden Nikotinanamnese, Alkoholanamnese, regelmäßige Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika, Kortikosteroiden, Immunsuppressiva und anderen Medikamenten, sowie Vorerkrankungen und deren diagnostische Abklärung (aus Unterlagen) eruiert.

55% dieser 79 Patienten gaben Oberbauchbeschwerden, Übelkeit, Völlegefühl und Ruktation an. Bei 60 (ca.76%) von 79 Patienten lag ein histopathologischer Befund vor. Bei 18% der Patienten war ambulant eine *Helicobacter*-Infektion durch CLO-Schnelltest festgestellt worden, worauf sie stationär aufgenommen wurden. Annähernd 30% der Patienten berichteten über Gastritis- oder Ulkuserkrankungen, die mehr als drei Jahre

zurücklagen. Bei 12% der Patienten lagen Herz-Kreislaufleiden mit entsprechender medikamentöser Therapie vor. Bei 22% der Patienten war hausärztlich eine festgestellte allergische Erkrankung bekannt.

5.1 Diagnostik und Prävalenzen einer *Helicobacter pylori*-Infektion

Bei der Auswahl der Patienten für die in dieser Studie angestrebte Serum-Analyse wurden strengere diagnostische Kriterien als im klinischen Bereich üblich angelegt.

Bei den 79 Patienten wurden folgende diagnostische Assays durchgeführt: CLO-Test, *H. pylori*-Anzucht, Histologie und ELISA auf *H. pylori*-spezifische Antikörper.

5.1.1 CLO-Test und *Helicobacter pylori*-Anzucht

Von den untersuchten 79 Patienten erwiesen sich 47 (59,5%) als CLO-positiv, 29 (36,7%) als CLO-negativ und bei 3 (3,8%) der Patienten konnte keine eindeutige Diagnose gestellt werden.

Bei 32 der 79 Patienten (40,59%) konnte eine *H. pylori*-Anzucht erzielt werden. Bei 38 Patienten (48,1%) war kein Wachstum zu beobachten. Bei 9 Patienten (11,39%) lag kein Material für die mikrobiologische Untersuchung vor.

5.1.2 Histologische Untersuchungsergebnisse

Für 60 der 79 ausgewählten Patienten standen histopathologische Befunde zur Verfügung. Bei den restlichen 19 Patienten konnte kein Material für die histopathologische Untersuchung gewonnen werden.

Die histologischen Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tab. 3: Anzahlen (n) und relative Häufigkeiten (%) histologisch begründeter Diagnosestellungen

| Diagnose | Personen | |
|------------------------------|----------|-------|
| | n | % |
| Normalbefund | 9 | 15,0 |
| Gastritis (H. p. assoziiert) | 16 | 26,6 |
| Gastritis (unspezifisch) | 10 | 16,6 |
| Ulcus ventr./duodeni | 11 | 16,6 |
| Karzinom ventr./oesoph. | 6 | 10,0 |
| MALT-Lymphom | 1 | 1,6 |
| Gastrale Metaplasie | 2 | 5,0 |
| Gastrale Dysplasie | 1 | 1,6 |
| Gastrale Hyperplasie | 1 | 1,6 |
| Gastrale Adenome | 1 | 1,6 |
| Polypen des Magens | 2 | 3,3 |
| Gesamt | 60 | 100,0 |

5.1.3 Ergebnisse der ELISA-Tests

Bei 46 der 79 Patienten war ausreichend Serum vorhanden, so dass zur Stützung eines *H. pylori*-Status ein spezieller Serum-ELISA-Test durchgeführt werden konnte.

Tabelle 4 zeigt die *H. pylori*-Antikörpertiter bei den klinisch untersuchten Patienten. Die hierbei festgestellten Serum-IgA- und IgG-Werte wurden auch als *H. pylori*-Infektions-Parameter für den *H. pylori*-Status in die Studie mit einbezogen.

Die Serum-IgA- und Serum-IgG-Antikörper-Titer lagen in der *H. pylori*-positiven Gruppe (n=24) signifikant höher im Vergleich zur *H. pylori*-negativen Gruppe (n=12). Unter den *H. pylori*-positiven Seren stellte das Serum eines Patienten (Blot Nr. 17) mit negativem Antikörper-Titer eine Ausnahme dar. Bei allen *H. pylori*-negativen Seren war der Antikörper-Titer negativ. Karzinompatienten zeigten unterschiedliche Serum-Antikörpertiter gegen *H. pylori*.

Tab. 4: ELISA -Titerergebnisse untersuchter Patienten

(H. p. = H. pylori)

| Serum (Blot) Nr. | Patientenkürzel | H. p.-Status | H. p.-spez.IgG (U/ml) | H. p.-spez.IgA (U/ml) |
|---------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| 2 | 8 Ka | H. p. positiv | 570 | hoch-pos |
| 3 | 3 Ka/UH-A | nicht eindeutig | 29 | 150 |
| 4 | 44 MPI | Karzinom | neg | neg |
| 6 | 46 MPI | nicht eindeutig | neg | neg |
| 7 | 47 MPI | nicht eindeutig | neg | neg |
| 13 | 40 MPI | H. p. negativ | neg | neg |
| 14 | 95 Ka | H. p. positiv | 250 | 38 |
| 15 | 41 MPI | H. p. positiv | 34 | 32 |
| 16 | 223 Ka | H. p. positiv | 160 | 39 |
| 17 | 54 MPI | H. p. positiv | neg | neg |
| 18 | 97 Ka | nicht eindeutig | neg | 22 |
| 19 | 23 Ka | H. p. positiv | 47 | 61 |
| 20 | 122 Ka | nicht eindeutig | neg | neg |
| 28 | 102 Ka | H. p. positiv | 900 | 12 |
| 31 | 112 Ka | H. p. positiv | 17 | 170 |
| 33 | 61 MPI | nicht eindeutig | 23 | neg |
| 37 | 184 Ka | Karzinom | pos | neg |
| 38 | 22 Ka | H. p. positiv | 24 | neg |
| 39 | 16 Ka/UH | H. p. positiv | 350 | 180 |
| 40 | 143 Ka | Metaplasie | 480 | 68 |
| 42 | 169 Ka | H. p. positiv | 24 | 30 |
| 43 | 31 Ka | H. p. positiv | 110 | neg |
| 44 | 119 Ka | eradiziert | 81 | neg |
| 45 | 80 Ka | eradiziert | 17 | 50 |
| 46 | 213 Ka | nicht eindeutig | neg | 25 |
| 47 | 64 Ka | H. p. positiv | 15 | 160 |
| 48 | 62 MPI | nicht eindeutig | neg | 25 |
| 49 | 224 Ka | eradiziert | neg | 28 |
| 102 | 28 MPI | H. p. negativ | neg | neg |
| 103 | 31 MPI | H. p. negativ | neg | neg |
| 104 | 42 MPI | H. p. negativ | neg | neg |
| 106 | 29 MPI | H. p. negativ | neg | neg |
| 107 | 33 MPI | H. p. negativ | neg | neg |
| 109 | 43 MPI | H. p. negativ | neg | neg |
| 110 | 45 MPI | nicht eindeutig | neg | neg |
| 111 | 60 MPI | H. p. negativ | neg | neg |
| 114 | 10 MPI | H. p. negativ | neg | neg |
| 116 | 38 MPI | H. p. negativ | neg | neg |
| 121 | 219 Ka | Karzinom | 57 | 72 |
| 123 | 52 MPI | H. p. positiv | 13 | neg |
| 124 | 59 MPI | H. p. positiv | 11 | 11 |
| 125 | 20 Ka | H. p. positiv | 100 | 31 |
| 126 | 202 Ka | H. p. positiv | neg | 17 |
| 127 | 226 Ka | H. p. positiv | 240 | pos |
| 128 | 192 Ka | H. p. positiv | 230 | 10 |
| 129 | 1 MPI | H. p. positiv | neg | neg |

Bei den 3 eradizierten Patienten gab es keine auffälligen Unterschiede in der Häufigkeit oder Höhe der Antikörper-Titer im Vergleich zu den übrigen Patientenseren.

5.1.4 Auswahlkriterien zur Definition des *Helicobacter pylori* - Status

Für die Definition eines eindeutigen *H. pylori*-Status wurden in dieser Studie folgende Parameter herangezogen: Histopathologischer Befund, CLO (Urease-Schnelltest), Bakterienkultur, ELISA-Titer und *H. pylori* -Infektion in der Anamnese (aus Unterlagen).

Als Patienten mit negativem *H. pylori*-Status sind diejenigen wurden gezählt, bei denen alle genannten Parameter negativ ausfielen, als eindeutig positiv diejenigen Patienten, bei denen mindestens drei Parameter positiv waren. Patienten, die diesen Kriterien nicht entsprachen, wurden einer dritten Gruppe zugeordnet (Tabelle 5).

Von 24 *H. pylori*-positiven Patienten erfüllten 20 Patienten vier Parameter und 4 Patienten drei Parameter.

Tab. 5: Kriterien für die Definition des *Helicobacter pylori*-Status.

| Eindeutig <i>H. p.</i>-negativ | Eindeutig <i>H. p.</i>-positiv | <i>H. p.</i>-Status nicht eindeutig |
|---|---|--|
| Alle diese Parameter negativ: 1. CLO-Test 3. Histologie 3. Kultur 4. ELISA 5. Keine <i>H. p.</i> -Infektion in der Anamnese | Mindestens drei dieser Parameter positiv: 1. CLO-Test 2. Histologie 3. Kultur 4. ELISA 5. <i>H. p.</i> -Infektion in der Anamnese | Weniger als drei Parameter positiv aber mit einem der folgenden histopathologischen Befunde: Ulkus, Dysplasie, Metaplasie, Lymphom, oder Karzinom |

5.1.5 Gruppeneinteilung für die Analyse der Immunoblots

Bei 55 der 79 Patienten wurden Immunoblots zur Reaktivität der Serum-Antikörper gegen *H. pylori* erstellt.

Unter den 55 Patienten, bei denen diese Untersuchungen durchgeführt wurden, waren nach der oben genannten Definition 24 eindeutig *H. pylori*-positiv und 12 eindeutig *H. pylori*-negativ. 19 Patienten wiesen nicht einen eindeutigen *H. pylori*-Status auf.

Bei 15 der 24 eindeutig *H. pylori*-positiven Patienten lag entsprechend dem histopathologischen Befund eine Gastritis vor, bei 6 ein Ulcus ventriculi, sowie bei 3 ein Ulcus duodeni. Bei den 12 *H. pylori*-negativen Patienten lag bei 9 eine Gastritis und bei 3 ein Ulcus vor.

Von den 19 nicht eindeutig *H. pylori*-positiven Patienten wurde in 5 Fällen die Diagnose Karzinom und in einem die Diagnose MALT-Lymphom gestellt, in 10 Fällen die Diagnose Magen- oder Duodenalulkus mit Gastritis.

Die übrigen 3 Fälle, bei denen histologisch eine Hyperplasie/Dysplasie oder eine erfolgreiche Eradikation vorlag, wurden wegen der geringen Anzahl nicht als eigene pathologische Gruppe erfaßt.

Bei Patientenzahlen, deren Größe eine statistische Auswertung zuließ, wurde somit folgende Gruppeneinteilung durchgeführt:

1. Gruppeneinteilung nach *H. pylori*-Status:

Gruppe 1: *H. pylori*-Status positiv, 24 Patienten

Gruppe 2: *H. pylori*-Status negativ, 12 Patienten

Gruppe 3: *H. pylori*-Status nicht eindeutig, 19 Patienten

2. Weitere Gruppeneinteilung der 24 *H. pylori*-positiven Patienten nach Krankheitsbild:
15 Patienten mit Gastritis und 9 mit Ulkus
3. 6 Karzinompatienten aus der Gruppe mit nicht eindeutigem *H. pylori*-Status
4. 13 weitere, nicht eindeutig *H. pylori*-positive Patienten.

5.2 Analyse von zweidimensionalen Gelen und Blots

Um eine Korrelation von Antigenerkennung mit den verschiedenen Krankheitsbildern der *H. pylori*-Infektion herstellen zu können, wurde die Reaktivität von Serumantikörpern der Patienten gegenüber unterschiedlichen Antigenen von *H. pylori* untersucht. Dazu wurde zunächst ein Standardgel mittels großgeltechnik (GGT) erstellt. Die *H. pylori*-Proteine wurden aus einem Gesamtlysate des sequenzierten *H. pylori*-Stammes 26695

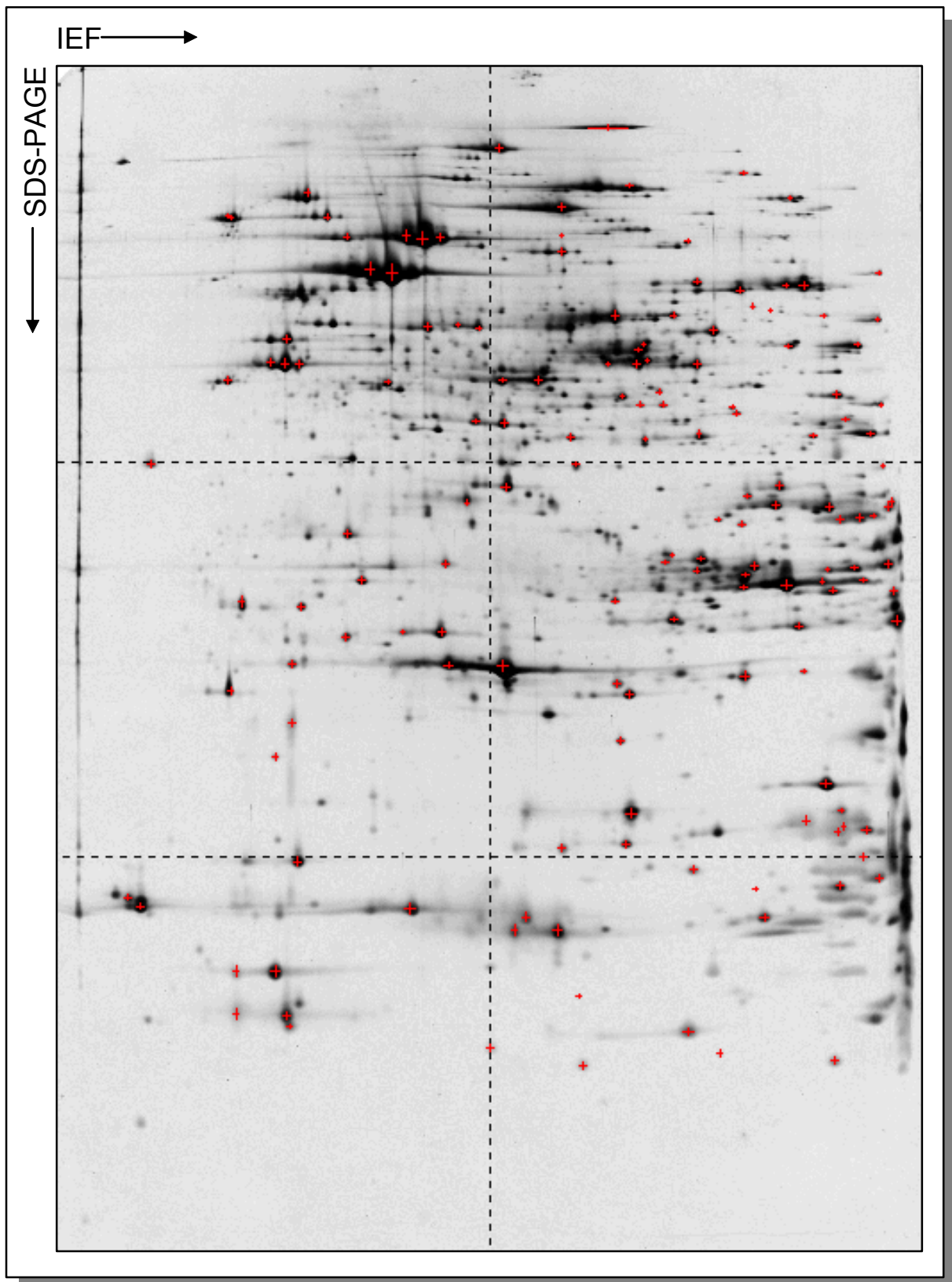


Abbildung 3: Darstellung der analytischen zweidimensionalen Auftrennung von *Helicobacter pylori* 26695 (in Silberfärbung) in der Datenbank des MPI. Markierte Proteinspots sind identifizierte Antigene (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin).

gewonnen und mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Identifizierung der einzelnen Proteinspezies aus diesem zweidimensionalen Gelmuster erfolgte durch Vergleich von Proteinspots auf diesem Gel nach Silberfärbung mit bereits bekannten Spots, die in einer Zweidimensionalen-Datenbank des Max-Planck-Institutes, zusammengestellt wurden (Abbildung 3).

In dieser Datenbank sind inzwischen über 150 identifizierten Proteinspots von *H. pylori*-26695 erfaßt. Die Identifizierung dieser Proteinspots war mittels Verdau von Coomassie-Gelen und anschließender Analyse mit Hilfe von MALDI-TOF-Massenspektrometrie gelungen.

Auf dem silbergefärbten zweidimensionalen Gelmembran konnten ca. 1800 Proteinspots von *H. pylori* 26695 detektiert werden (Abbildung 4). Damit war eine Grundlage für den Vergleich von Proteinen, die durch Patientenseren erkannt wurden, geschaffen. Für jedes der 55 Patientenseren waren zwei Gele mittels Kleingeltechnik (KGT) erstellt und mittels Immunoblot gefärbt worden. Aufgrund der geringen Mengen an jeweils zur Verfügung stehendem Serum und der großen Anzahl an zu untersuchenden Gelen wurde der KGT gegenüber GGT der Vorzug gegeben.

Sämtliche Serumproben der 55 Patienten wurden jeweils einem IgA- und einem IgG-Immunoblot-Assay unterzogen.

Nach Inkubation der auf PVDF-Membranen geblotteten zweidimensionalen Gele aus den Seren der verschiedenen Patienten konnten 379 Proteinspots von *H. pylori*-26695 (PA4-Gel) auf Immunoblots detektiert werden. Diese Spots wurden in den einzelnen Immunoblots nach ihrer Intensität visuell ausgewertet.

Zur visuellen Auswertung der Immunoblots wurden diese auf eine Leuchtplatte gebracht. Zunächst werden sie im Gesamtüberblick miteinander verglichen und auffällige Unterschiede notiert. Dann erfolgte der Vergleich der Proteine Spot für Spot nach einzelnen Sektoren. Für die visuelle Auswertung der Spots waren 5 Intensitätsgrößen vorgegeben. Die Intensität eines bestimmten Spots wurde auf einer speziellen Skala von 0,5 bis 4 klassifiziert.

Außerdem wurde für jede Gruppe von Seren eine Signalfrequenz berechnet, welche das Auftreten einer Erkennung und die Intensität des Spots für einen semiquantitativen Vergleich wie er in früheren Studien (JUNGBLUT et al., 1999) definiert worden ist, berücksichtigt.

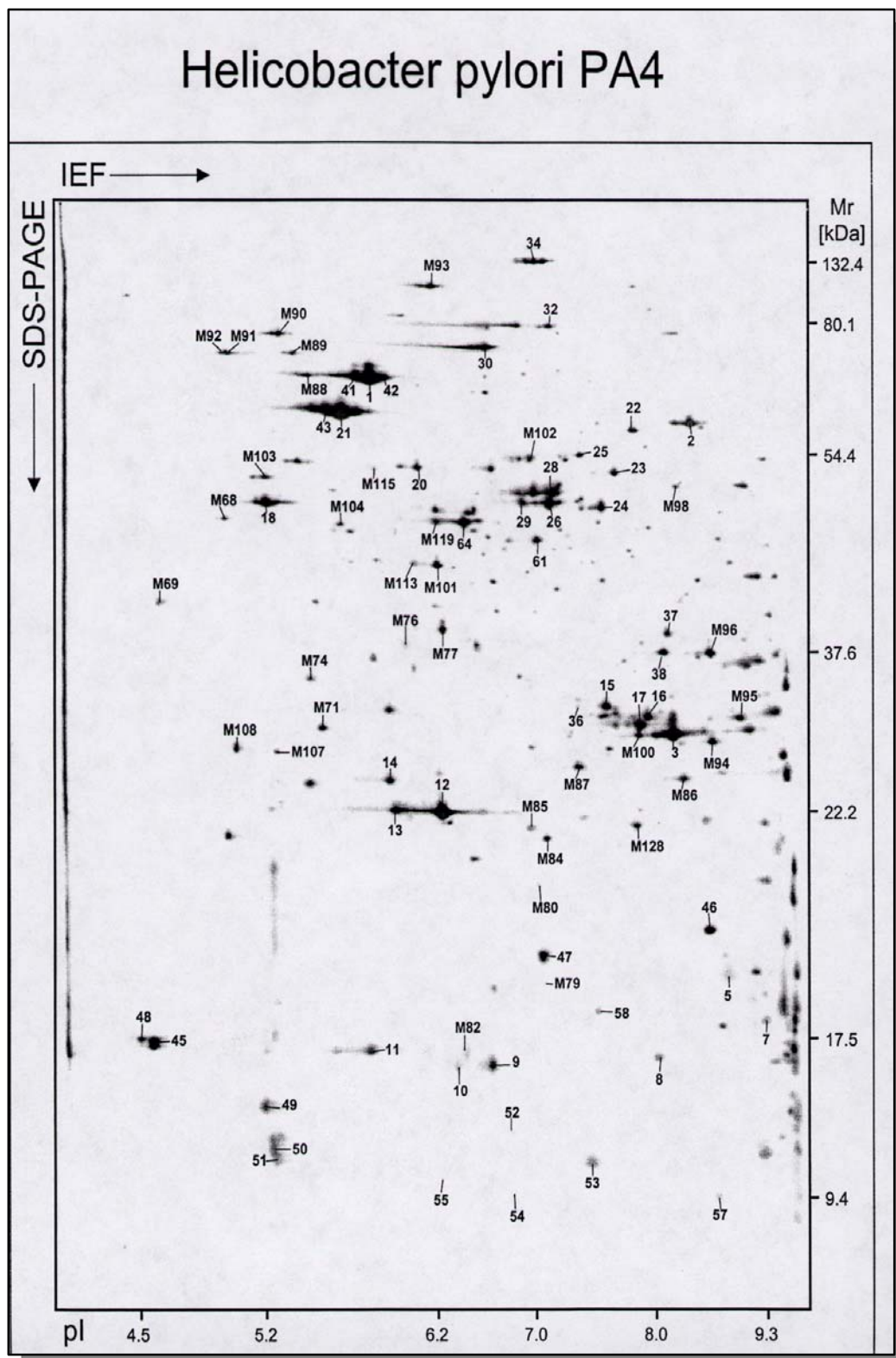


Abbildung 4: Analytische Auftrennung der Proteine von *H. pylori* 26695 (PA4-Gel) in Silberfärbung (IEF: Isoelektrische Fokussierung = Auftrennung nach Ladung, Mr: Molekulargewicht in Dalton)

Abbildung 5 zeigt im Vergleich die Immunoblots von zwei verschiedenen Patienten.

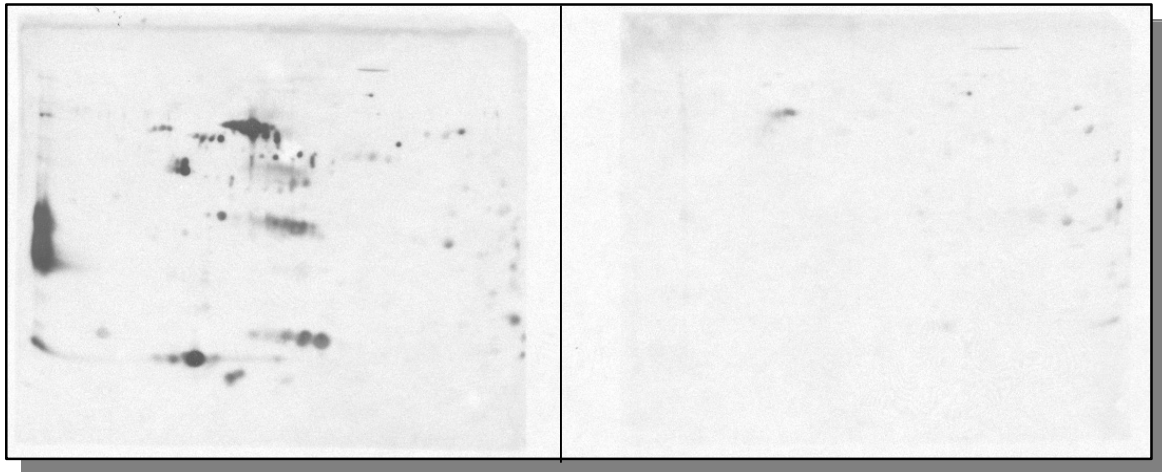


Abbildung 5: Vergleich der Immunoblots eines *H. pylori*-positiven Ulkus- (links) und eines *H. pylori*-negativen Gastritispatienten (rechts) in Commasie-Blue -Färbung.

Nach visueller Auswertung der Proteinspots wurde für jeden Spot dessen Intensität bei Erkennung in den jeweiligen Seren tabellarisch zusammengestellt. Dann wurden die Spots auf den Immunoblots mit den Spots auf dem Standardgel verglichen (Abb. 3) und somit die jeweils erkannten Proteine identifiziert.

5.3 Qualitative Auswertung der Immunoblots

Für jede Krankheitsgruppe wurden anhand der quantifizierten Spotstärken, d.h. der Intensitäten, deren Signalfrequenzen berechnet. Unter Signalfrequenz versteht sich die Summe der Intensitäten der Proteinspots einer Gruppe von n-Seren bezogen auf die maximal erreichbare Intensitätsstärke der Gruppe von n-Seren. Die Signalfrequenz wurde bereits in einer früheren Studie (JUNGBLUT et al., 1999) beschrieben.

Als Beispiel werden nachfolgend 4 Immunoblots von Seren eines Patienten ohne *H. pylori*-Infektion (Abbildung 5A) und jeweils eines Patienten mit *H. pylori*-assoziierter Gastritis (Abbildung 5B), *H. pylori*-assoziertem Ulkus (Abbildung 5C) sowie mit Karzinom (Abbildung 5D) gezeigt.

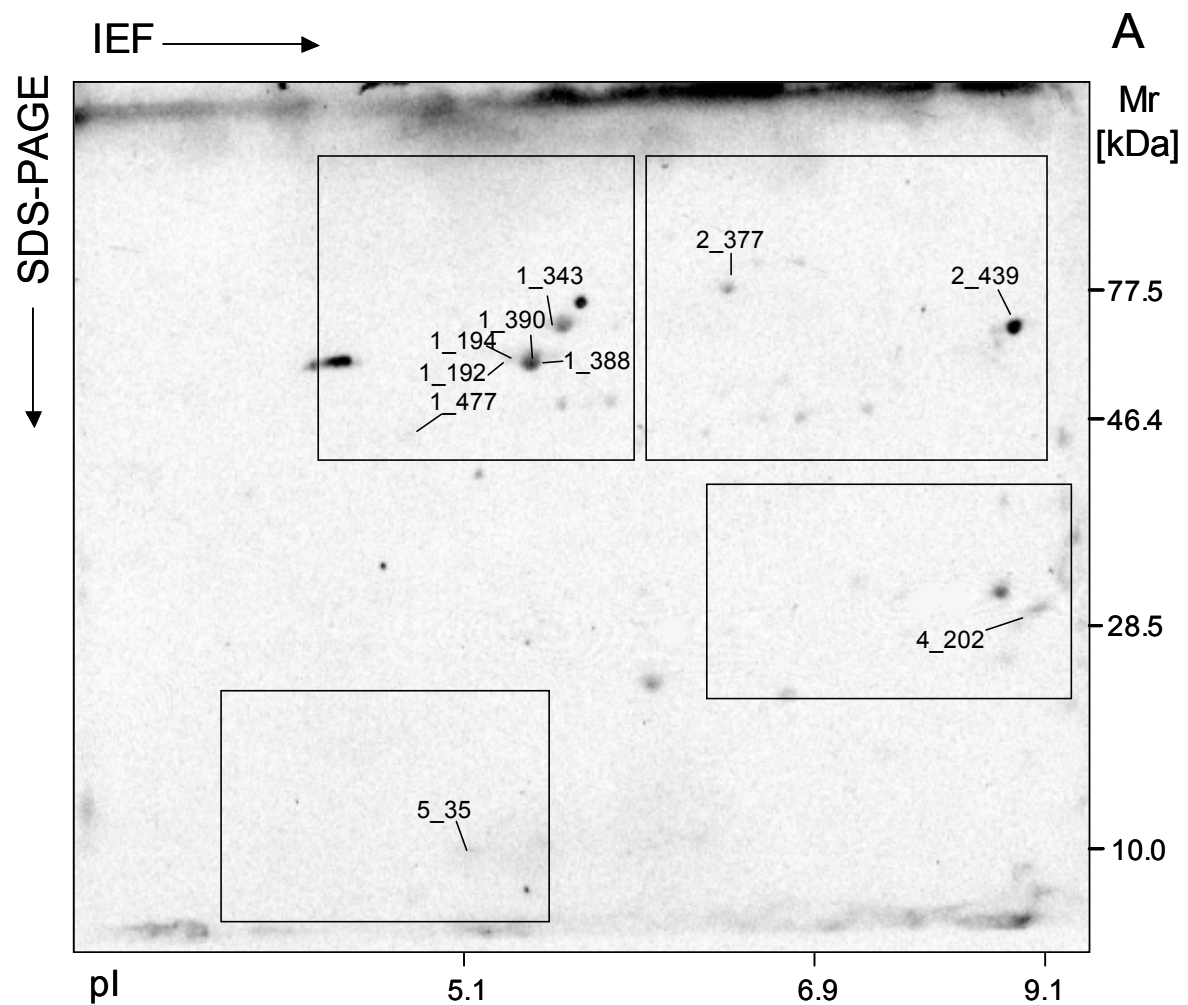


Abbildung 5A: Eindeutig identifizierte Antigene (Proteinspots) des *H. pylori*-26695-Stammes, die nach Immunfärbung der 2-DE-Blots durch Seren von Patienten mit nicht *H. pylori*-assoziierter Gastritis erkannt wurden.

Die einzelnen Proteinspots sind durch ihre Identitätsnummer und durch vorangestellte Ziffern von 1_ bis 6_ entsprechend ihrer Position auf einer der 6 Sektoren der Blots in der 2-DE-Datenbank gekennzeichnet.

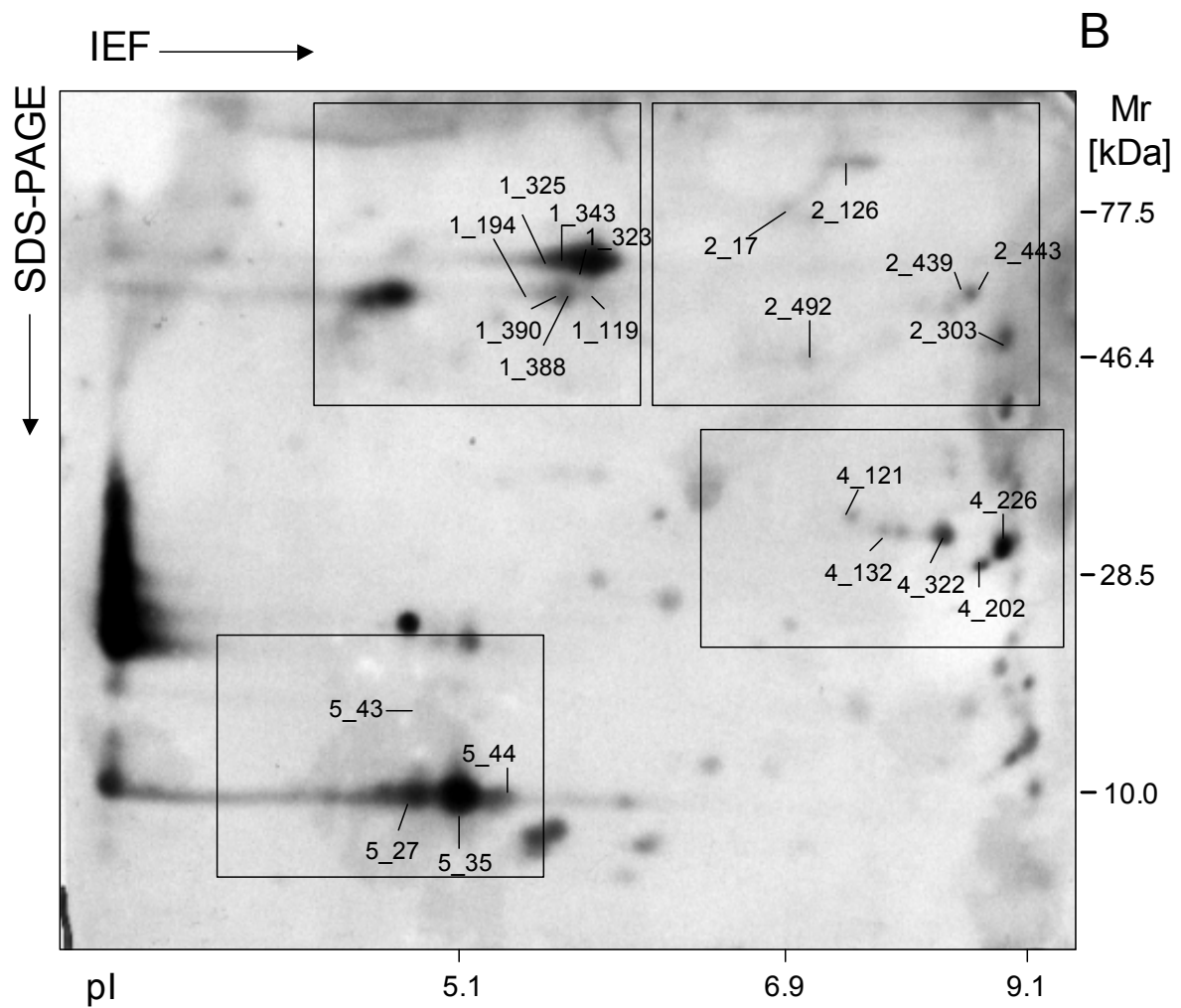


Abbildung 5B: Eindeutig identifizierte Antigene (Proteinspots) des *H. pylori*-26695-Stammes, die nach Immunfärbung der 2-DE-Blots durch Seren von Patienten mit *H. pylori*-assoziiierter Gastritis erkannt wurden.

Die einzelnen Proteinspots sind durch ihre Identitätsnummer und durch vorangestellte Ziffern von 1_ bis 6_ entsprechend ihrer Position auf einer der 6 Sektoren der Blots in der 2-DE-Datenbank gekennzeichnet.

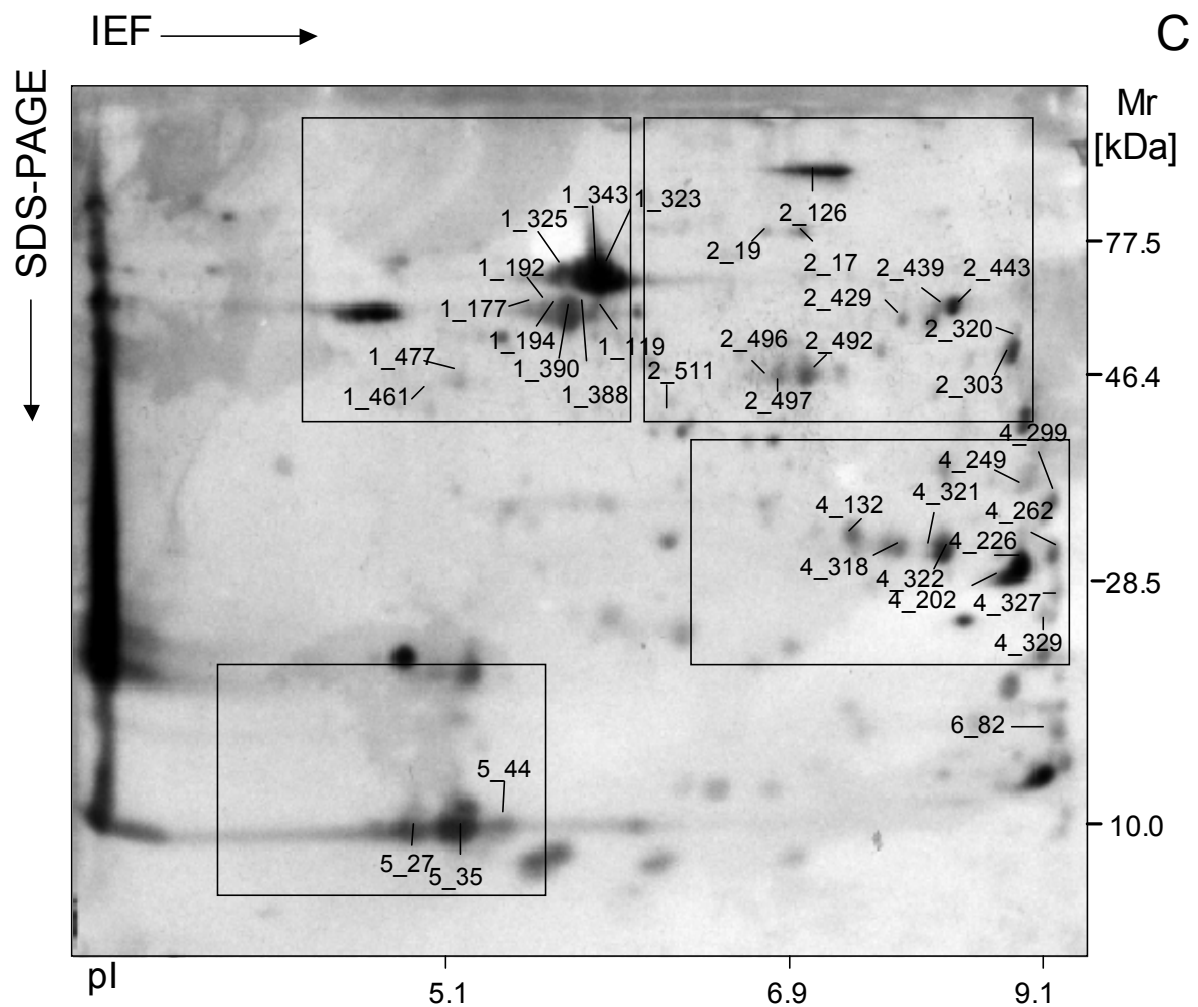


Abbildung 5C: Eindeutig identifizierte Antigene (Proteinspots) des *H. pylori*-26695-Stammes, die nach Immunfärbung der 2-DE-Blots durch Seren von Patienten mit Ulcus ventriculi et duodeni erkannt wurden. Die einzelnen Proteinspots sind durch ihre Identitätsnummer und durch vorangestellte Ziffern von 1_ bis 6_ entsprechend ihrer Position auf einer der 6 Sektoren der Blots in der 2-DE-Datenbank gekennzeichnet.

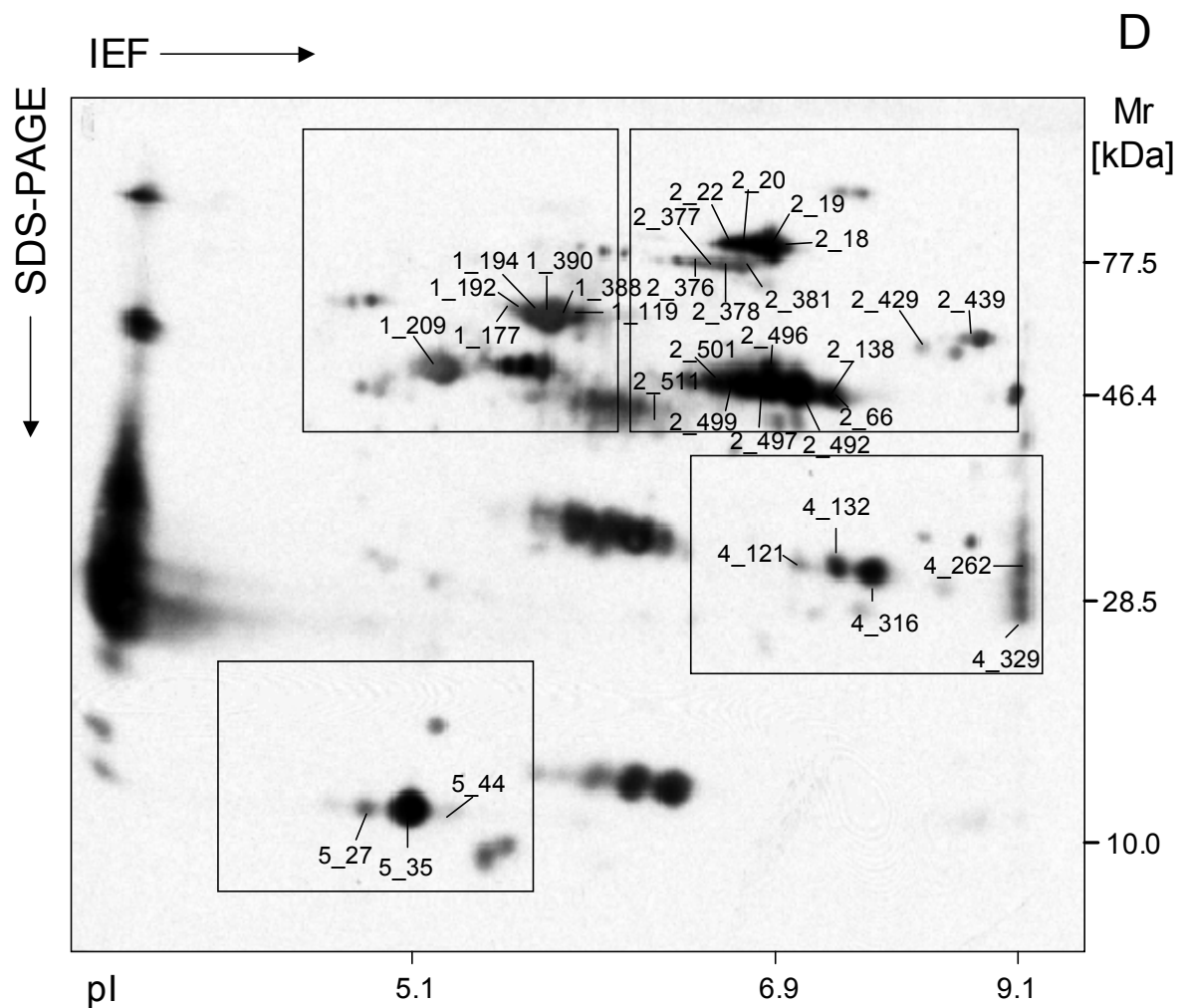


Abbildung 5D: Eindeutig identifizierte Antigene (Proteinspots) des *H. pylori*-26695-Stammes, die nach Immunfärbung der 2-DE-Blots durch Seren von Patienten mit Magenkarzinom erkannt wurden. Die einzelnen Proteinspots sind durch ihre Identitätsnummer gekennzeichnet Sie sind in den Identifikationsgelen und Tabellen zur schnelleren Auffindung durch die vorgestellten Buchstaben A – F für die einzelnen 6 Sektoren des Gels gekennzeichnet. In der 2 – DE – Datenbank sind die Gele aus technischen Gründen durch vorangestellte Ziffern von 1_ bis 6_ entsprechend ihrer Position auf einer der 6 Sektoren der Blots in der 2-DE-Datenbank gekennzeichnet. Daher wurde diese Nomenklatur der Sektoren 1_ bis 6_ auf den aus einer Datenbank übernommenen Abbildungen beibehalten, ist aber ganz einfach den Buchstaben A – F zuzuordnen.

In der Silberfärbung waren sieben Serienspots detektiert worden, die verschiedenen Proteinspezies des gleichen Proteins entsprechen. Diese Proteinspezies stellen Hauptantigene von *H. pylori* dar (Tab.7). GroEL-Protein (HP0010, Hauptspot A390) [entspricht 1_390], 50S ribosomales Protein L7/L12 (HP1199, Hauptspot E35) [entspricht 5_35] und Katalase (HP0875, Hauptspot B439 [entspricht 2_439]) reagierten mit den Seren aller vier Patienten in Abbildungen 5A-D. Urease B (HP0072, Hauptspot A343 [entspricht 1_343]) reagierte sowohl mit den Seren von *H. pylori*-negativen als auch von Gastritis- und Ulkuspatienten, während die Spotserie von Cag 26 (Cag A) (HP0547, Spot B126 [entspricht 2_136]) nur mit Seren von Gastritis- und Ulkuspatienten reagierte (Abbildungen 5B und 5C). Die Isocitrat-Dehydrogenase (HP0027, Hauptspot B492 [entspricht 2_492]) und das Putative-Neuraminyl-Lactose-Bindungs-Protein, HpaA (HP0410, Hauptspot D132 [entspricht 4_132]) reagierten mit Gastritis-, Ulkus- und Krebsseren (Abbildungen 5B-D).

5.4 Quantitativer Vergleich der Immunoblots von *Helicobacter pylori* - positiven Patienten mit *Helicobacter pylori* - negativen Patienten

Um den grundlegenden Einfluß einer *H. pylori*-Infektion auf die Muster der Antigenerkennung zu untersuchen, wurde die Reaktivität der Seren auf den Immunoblots von 24 *H. pylori*-positiven und 12 *H. pylori*-negativen Patienten verglichen (Tabelle 6). Die Anzahl der Spots, die durch Seren von *H. pylori*-positiven Patienten erkannt wurde, war weit gestreut im Bereich n=7-153 (Mittelwert 52 Spots), während durch Seren von *H. pylori*-negativen Patienten erkannten Spots im Bereich n=3-66 lag (Mittelwert 20 Spots).

Tab. 6: Anzahl der Proteinspots, die durch Seren von *H. pylori*-positiven und *H. pylori*-negativen Patienten erkannt wurden

| Immunoblots <i>H. pylori</i> -positiver Patienten | | Immunoblots <i>H. pylori</i> -negativer Patienten | |
|---|------------------|---|------------------|
| Blot-Nr. (n=24) | Anzahl der Spots | Blot-Nr. (n=12) | Anzahl der Spots |
| 2 | 118 | 13 | 17 |
| 14 | 153 | 35 | 3 |
| 15 | 66 | 102 | 17 |
| 16 | 56 | 103 | 14 |
| 17 | 87 | 104 | 15 |
| 19 | 95 | 106 | 24 |
| 28 | 26 | 107 | 23 |
| 29 | 49 | 109 | 36 |
| 31 | 39 | 111 | 21 |
| 34 | 23 | 112 | 19 |
| 36 | 7 | 114 | 51 |
| 38 | 31 | 116 | 66 |
| 39 | 42 | | |
| 42 | 43 | | |
| 43 | 43 | | |
| 47 | 35 | | |
| 122 | 21 | | |
| 123 | 75 | | |
| 124 | 89 | | |
| 125 | 104 | | |
| 126 | 60 | | |
| 127 | 125 | | |
| 128 | 119 | | |
| 129 | 34 | | |

Insgesamt wurden in *H. pylori*-positiven Patientenseren 310 unterschiedliche Proteinspots (Antigene) erkannt. Hiervon wurden 116 jedoch ausschließlich in Seren von *H. pylori*-positiven Patienten erkannt, während 156 Spots eine höhere Signalfrequenz gegenüber den Seren von negativen und 38 Spots bei Seren von positiven und negativen Patienten die gleiche Signalfrequenz aufwiesen.

Tabelle 7 listet Spots und zugehörige Proteine auf, die durch Seren von *H. pylori*-positiven Patienten mit einer Signalfrequenz oberhalb einer Schwelle von 10 erkannt

Tab. 7: In *H. pylori*-positiven Seren (n=24) und *H. pylori*-negativen Seren (n=12) erkannte Antigene mit der Signalfrequenz > 10 bei den positiven. (KGT : Kleingeltechnik, GGT: Großgeltechnik, ORF: Open reading frame, Sektoren A-F in GGT entsprechen 1_5_ in der Datenbank und in den Abbildungen)

| Spot Nr. | GGT | ORF | Antigene | <i>H. p.</i> -positive Seren (n=24) Frequenz | <i>H. p.</i> -negative Seren (n=12) Frequenz |
|----------|------|--------|---|---|---|
| 74 | A177 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 14,58 | 0,00 |
| 77 | A194 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 31,77 | 13,54 |
| 80 | A390 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 37,50 | 13,54 |
| 90 | A388 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 36,98 | 11,46 |
| 215 | A192 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 26,04 | 7,29 |
| 290 | A119 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 17,71 | 1,04 |
| 70 | E44 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L7/L12 | 29,69 | 2,08 |
| 87 | E35 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L7/L12 | 60,94 | 27,08 |
| 140 | E27 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L7/L12 | 27,60 | 6,25 |
| 92 | A343 | HP0072 | Urease B | 28,13 | 14,58 |
| 273 | A325 | HP0072 | Urease B | 23,96 | 11,46 |
| 301 | A323 | HP0072 | Urease B | 23,96 | 4,17 |
| 102 | A209 | HP1132 | ATP-Synthase B | 16,15 | 1,04 |
| 109 | A477 | HP1205 | Elongationsfaktor-(EF-TU) | 17,71 | 3,13 |
| 129 | - | - | nicht identifiziert | 13,54 | 0,00 |
| 141 | - | - | nicht identifiziert | 11,98 | 1,04 |
| 145 | - | - | nicht identifiziert | 10,42 | 0,00 |
| 147 | A461 | HP1293 | DNA-abhängige RNA Polymerase | 16,67 | 5,21 |
| 171 | D262 | HP1098 | Hypothetical Protein | 13,54 | 23,96 |
| 187 | A396 | - | nicht identifiziert | 15,10 | 1,04 |
| 207 | - | - | nicht identifiziert | 25,52 | 0,00 |
| 209 | - | - | nicht identifiziert | 25,52 | 0,00 |
| 214 | - | - | nicht identifiziert | 19,27 | 3,13 |
| 238 | - | - | nicht identifiziert | 14,06 | 1,04 |
| 135 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 28,65 | 0,00 |
| 244 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 37,50 | 0,00 |
| 251 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 36,46 | 0,00 |
| 259 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 36,46 | 0,00 |
| 263 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 32,81 | 0,00 |
| 270 | B19 | HP0192 | Fumarat-Reduktase (Flavoprotein) | 16,67 | 0,00 |
| 276 | - | - | nicht identifiziert | 28,13 | 2,08 |
| 294 | - | - | nicht identifiziert | 11,46 | 0,00 |
| 297 | - | - | nicht identifiziert | 26,04 | 1,04 |
| 298 | - | - | nicht identifiziert | 25,52 | 1,04 |
| 327 | A424 | HP0599 | Hämolsin-Sekretions-Protein | 26,56 | 2,08 |
| 339 | - | - | nicht identifiziert | 13,54 | 1,04 |
| 341 | A107 | HP1307 | 50S ribosomales Protein L5 | 11,46 | 0,00 |
| 437 | D322 | HP0073 | Urease A | 33,33 | 27,08 |
| 591 | D321 | HP0073 | Urease A | 19,27 | 4,17 |
| 527 | D132 | HP0410 | Putative Neuraminy-Lactose-Bindung (hpaA) | 11,98 | 3,13 |
| 528 | B488 | HP0829 | Inosine-5-Monophosphatase-DH | 11,46 | 2,08 |
| 552 | D132 | HP0410 | Putative Neuraminy-Lactose-Bindung (hpaA) | 16,67 | 7,29 |
| 561 | D265 | HP0400 | Penicillin-Toleranz-Protein | 12,50 | 1,04 |
| 562 | D202 | HP1564 | Protein der Außenmembran | 18,23 | 4,17 |
| 566 | D314 | HP1582 | Pyridoxal Phosphatase (biosynth.Protein) | 11,46 | 7,29 |
| 567 | D318 | HP0318 | Hypothetical Protein | 12,50 | 7,29 |
| 598 | B429 | HP1019 | Serin-Protease HtrA | 10,42 | 0,00 |
| 608 | B437 | HP0875 | Katalase | 23,44 | 1,04 |
| 622 | B439 | HP0875 | Katalase | 48,44 | 26,04 |
| 639 | B443 | - | nicht identifiziert | 14,06 | 0,00 |
| 649 | - | - | nicht identifiziert | 13,02 | 0,00 |
| 692 | B303 | HP1350 | Protease | 29,69 | 8,33 |
| 694 | - | - | nicht identifiziert | 18,75 | 6,25 |
| 700 | B320 | HP1152 | Teilchen-Protein Ffh | 24,48 | 4,17 |

worden sind. In einer statistischen Analyse wurde ein Vergleich durchgeführt, um das Auftreten oder die Intensität der Erkennung aus Seren der *H. pylori*-positiven Gruppe mit der *H. pylori*-negativen Gruppe zu vergleichen. Signifikant höheres Auftreten oder eine signifikante Intensität der Erkennung ($p < 0,059$) sind markiert.

42 proteinarten bestehend aus 32 Antigenen wurden durch positiven Seren mit einer Signalfrequenz von über 10 erkannt (Abbildungen 5B und 5C) Die Antigene mit den höchsten Signalfrequenzen (>20), die durch Seren von *H. pylori*-positiven Patienten detektiert worden waren: 50S ribosomales Protein L7/L12 (HP1199, Spot 5_35), Katalase (HP0875, Spot 2_439), GroEL (HP0010, Spot 1_390), Cag 16 (HP0537, Spot 2_466), Cag 26 (HP0547, Spot 2_126), Urease A (HP0073, Spot 4_322), Urease B (HP0072, Spot 1_343), Hämolysin-Sekretions-Protein HylB (HP0599, Spot 1_424), Teilchen-Protein Ffh (HP1152, Spot 2_320) und *H. p.*predicted coding region (HP0231, Spot 4_226). Bis auf Cag 16 und HylB sind alle diese Antigene auf den Blots in den Abbildungen 5B und 5C gefärbt (Fenster der Sektoren 1_, 2_, 4_ und 5_).

In Seren von *H. pylori*-negativen Patienten wurden nur sieben Antigene gefunden, die eine Signalfrequenz > 10 besaßen. Am deutlichsten zu erkennen mit einer Signalfrequenz von > 20 waren das 50S ribosomale Protein L7/L12, Urease A, Katalase und das Hypothetical-Protein HP1098 (Spot 4_262). Die Färbung des 50S ribosomales Protein L7/L12 (Spot 5_35) und Katalase (Spot 2_439) ist auch in Abbildung 5A dargestellt.

Sechs identifizierte Proteine sind nur durch positive Seren erkannt worden: Die predicted coding region (HP 0231, Spot 4_226), Serin-Protease HtrA, Cag 26 (HP0547, Spot 2_126), Cag 3 (HP0552, Spot 2_443), ClpB-Protein (HP0264, Spot 1_308) und Trigger factor HP0795 (Spot A411) (Abbildungen 5B und 5C).

Bei der Isocitrat-Dehydrogenase und dem 50S ribosomalen Protein L7/L12 wurden jeweils mehrere Proteinunterarten erkannt. Zwei Proteinarten der Isocitrat-Dehydrogenase, Spot 487 (B497, 2_497) und Spot 489 (B496, 2_496) wurden nur durch positive Seren erkannt, dagegen der Hauptspot 492 (2_492) durch sowohl positive als auch negative Seren (nicht dargestellt) (Abbildungen 5B-D). Eine der

Proteinarten des 50S ribosomalen Proteins L7/L12 (Spot 5_44) wurde ebenfalls nur durch positive Seren erkannt.

Sechs identifizierte Proteinarten wurden nur durch ein *H. pylori*-negatives Serum mit einer Intensität von 0,5 erkannt, aber in verschiedenen anderen Kombinationen nur durch *H. pylori*-positive Seren.

Die folgenden relativ deutlich erkannten Proteine wurden durch die meisten Seren erkannt: das Cag 26 Protein (Cag A), ein typisches Kennzeichen für die Untergruppe von Typ I des *Helicobacter*-Stammes wurde durch 14/24 positiven Seren erkannt, *H. p.* predicted coding region (HP0231, Spot 4_226) und ATP-Synthase A (HP1134, Spot 1_396) wurden jeweils durch 11/24 positive Seren erkannt, die Serin-Protease (HP1019, Spot 2_429) wurde durch 9/24 und die Fumarat-Reduktase (HP0192, Spot 2_17) wurde durch 8/24 positive Seren erkannt. Das bis dahin unidentifizierte Proteinspot 5_53 wurde ebenfalls nur durch ein einziges Serum erkannt (nicht dargestellt). Verschiedene Kombinationen dieser Proteine waren auf einzelnen Blots zu erkennen: Fumarat-Reduktase (Spot 2_17), Cag 26 (Spot 2_126), Cag 3 (Spot 2_443), das 30S ribosomale Protein S5 (HP1302, Spot 6_82) und *H. p.* predicted coding region (HP0231, Spot 4_226) wurden auf den Blots erkannt, die durch Gastritis- und Ulcus-Serum gefärbt waren (Abbildungen 5B-C), wohingegen die Serin-Protease (Spot 2_17), 30S ribosomales Protein S5 (Spot 6_82), ATP-Synthase A (Spot 1_396), Cag 26 (Spot 2_443) durch Seren von Gastritis- oder Ulcuspatienten auf anderen Gelen erkannt wurden (nicht dargestellt).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Antikörper durch *H. pylori*-positive Seren im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr Proteinarten mit höherer Intensität in verschiedenen Mustern erkannt wurden. Einige wenige identifizierte Antigene zeigten einen sehr hohen Erkennungsgrad.

Bei 81% der Spots (126 aus 156), die sowohl bei positiven als auch bei negativen Seren auftraten, lag die Durchschnittsintensität bei den *H. pylori*-positiven eindeutig höher als bei den *H. pylori*-negativen.

Tab. 8: Die nicht mit *H. pylori*-negativen Seren reagierten Proteinspezies. (KGT : Kleingeltechnik, GGT: Großgeltechnik, ORF: Open reading frame, Sektoren A-F in GGT entsprechen 1_5_ in der Datenbank und in den Abbildungen)

| KGT | GGT | ORF | Antigene | Freq. <i>H. p.</i> -pos. Seren | Freq. <i>H. p.</i> -neg. Seren |
|-----|------|--------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 8 | D226 | HP0231 | <i>H. p.</i> predicted coding region | 22,92 | 0 |
| 74 | A177 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 14,58 | 0 |
| 129 | A308 | HP0264 | Clp Protein | 14,00 | 0 |
| 135 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 28,65 | 0 |
| 194 | E44 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L7/ L12 | 5,73 | 0 |
| 209 | A411 | HP0795 | Trigger-Faktor | 19,00 | 0 |
| 341 | A107 | HP1307 | 50S ribosomales Protein S5 | 11,46 | 0 |
| 487 | B497 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 7,29 | 0 |
| 489 | B496 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 7,29 | 0 |
| 598 | B429 | HP1019 | Serin-Protease (HtrA) | 10,42 | 0 |
| 639 | B443 | HB0522 | Cag 3 | 14,00 | 0 |
| 244 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 37,50 | 0 |
| 251 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 36,46 | 0 |
| 259 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 36,98 | 0 |

5.4.1 Häufig erkannte Antigene in beiden Gruppen

Zunächst wurden Spots identifiziert, die durch die Mehrzahl der *H. pylori*-positiven bzw. der negativen Seren erkannt wurden.

Folgende Antigene bzw. Proteinspots waren bei 20 der 24 eindeutig *H. pylori*-positiven Seren zu erkennen:

50S ribosomales Protein L7/L12,
 Katalase,
 GroEL,
 Cag A,
 Urease A und B,
 Protease,
 Hämolysin-Sekretions-Protein,
 Teilchen-Protein Ffh,
 Predicted coding region,

Spots 207, 276, 297, 298 (nicht identifiziert)

Antigene, die durch 11 der eindeutig *H. pylori*-negativen Seren erkannt wurden, waren:

50S ribosomales Protein L7/L12,
Urease A,
Katalase,
Hypothetical Protein (HP1098)

5.4.2 Durch *Helicobacter pylori*-negativen Seren selten erkannte Proteine

Die durch *H. pylori*-positive Seren häufig erkannten 15 Proteinspots waren nur bei einem der 12 eindeutig *H. pylori*-negativen Seren vorhanden. Diese Antigene sind in Tabelle 10 aufgeführt. Davon waren 5 nicht identifizierbar.

Tab. 9: Durch die gesamten *H. pylori*-negativen Seren (n=12) nur einmal erkannten Proteinspots mit Frequenzvergleich zu *H. pylori*-positiven .(KGT : Kleingeltechnik,GGT: Großgeltechnik, ORF: Open reading frame, Sektoren A-F in GGT entsprechen 1_5_ in der Datenbank und in den Abbildungen)

| KGT | GGT | ORF | Antigen | Freq. <i>H. p.</i> -pos. Seren | Freq. <i>H. p.</i> -neg. Seren |
|-----|------|--------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 270 | B17 | HP0192 | Fumarat-Reduktase (Flavoprotein) | 16,67 | 1,04 |
| 102 | A209 | HP1132 | ATP-Synthase B | 16,15 | 1,04 |
| 290 | A119 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 17,71 | 1,04 |
| 561 | D265 | HP0400 | Penicillin-Toleranz-Protein | 12,50 | 1,04 |
| 293 | B17 | HP0192 | Fumarat-Reduktase (Flavoprotein) | 8,85 | 1,00 |
| 608 | B437 | HP0875 | Katalase | 23,44 | 1,04 |
| 807 | A359 | HP0109 | DnaK Protein (HSP 70) | 11,46 | 1,04 |
| 141 | A464 | - | - | 11,98 | 1,04 |
| 187 | A396 | HP1134 | ATP synthase alpha chain | 15,10 | 1,04 |
| 238 | E53 | - | nicht identifiziert | 14,06 | 1,04 |
| 339 | B3 | - | nicht identifiziert | 13,54 | 1,04 |
| 297 | - | - | nicht identifiziert | 26,04 | 1,04 |
| 298 | - | - | nicht identifiziert | 25,52 | 1,04 |

5.4.3 Antigene mit höherer Frequenzstärke in *Helicobacter pylori*-negativen Seren

Drei Antigene waren bei den *H. pylori*-negativen Seren frequenzstärker aufgetreten als bei den positiven. Einen Vergleich dieser Spots und der Frequenzangaben zeigt Tabelle 10.

Tab. 10: Spots mit größerer Frequenz bei *H. pylori*-negativen gegenüber *H. pylori*- positiven Seren
(KGT : Kleingeltechnik,GGT: Großgeltechnik, ORF: Open reading frame, Sektoren A-F in GGT entsprechen 1_5_ in der Datenbank und in den Abbildungen)

| KGT | GGT | ORF | Antigene | Freq. <i>H. p.-pos.</i> Seren | Freq. <i>H. p.-neg.</i> Seren |
|-----|----------|--------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 171 | D262 | HP1098 | Hypothetical-Protein | 13,54 | 23,96 |
| 513 | B66+B138 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase mit assoziiertem Protein | 8,33 | 11,46 |
| 745 | D327 | HP1285 | Conserved hypothetical protein | 13,54 | 19,79 |

5.5 Qualitativer und quantitativer Vergleich der Immunoblots bei den Krankheitsgruppen Gastritis, Ulkus und Karzinom

Bei *H. pylori*-infizierten Patienten wurde entweder Gastritis oder Ulcus diagnostiziert. Durch Seren von Ulcuspatienten wurden mehr Proteinarten mit höherer Signalintensität erkannt als durch die meisten der Gastritispatienten. Um die Hypothese einer Korrelation zwischen Antigenerkennung und klinischen Symptomen zu testen, wurde eine statistische Analyse der Antigenmuster der Seren von 15 verschiedenen Patienten mit *H. pylori*-assoziiierter Gastritis und von 9 Patienten mit gastralem oder duodenalem Ulkus durchgeführt. Diese Analyse hat 23 Proteinarten von 19 Proteinen mit einem signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) in Bezug auf die Erkennung oder die Signalintensität aufgedeckt. Da nur 3 Patienten an duodenalem Ulkus litten, war keine weitere statistische Analyse zur Unterscheidung zwischem gastralem und duodenalem Ulkus möglich.

Die Identifizierung folgender Proteine (Abbildungen 5B-C) zeigte eine signifikant unterschiedliche Erkennung durch Seren von Ulkuspatienten im Vergleich zu Seren von Gastritispatienten ($p < 0,05$): Conserved hypothetical protein (HP1285, Spot 4_327), Vorläufer-Protein Hämolyse Sekretion (HP0175, Spot 4_249), ein hypothetical Protein (HP0305, Spot 4_276), ein Teilchen-Protein (HP1152, Spot 2_320), das 50S ribosomale Protein L9 (HP0514, Spot 6_68), und das 30S ribosomale Protein S5 (HP1302, Spot 6_82), Elongationsfaktor EF-TU (HP1205, Spot 1_477), Cag 16 (HP1133, Spot 2_466), und die noch nicht identifizierte Proteinart 2_465. Zwei Proteinarten des metabolischen Enzyms Isocitrat-Dehydrogenase (Spot 2_492 und

Spot 2_499) und eine des 50S ribosomalen Proteins L7/L12 (HP1199, Spot 5_44), welche beide als Reihe von Spots auf den Gelen auftraten, wurden ebenfalls öfter erkannt durch Seren von Ulcuspatienten, während andere Arten dieser Proteine keine signifikanten Unterschiede bei der Erkennung zeigten. Von den 23 Proteinarten, die signifikante Unterschiede bei der Antigenerkennung zeigten, wurden 11 signifikant öfter in Seren von Ulcuspatienten verglichen mit Gastritispatienten erkannt ($p < 0,05$). Acht Proteinarten zeigten eine signifikant höhere durchschnittliche Intensität ($p < 0,05$), und sieben erfüllten beide Kriterien. Nur wenige Antigene wie das Hydantoin-Utilisationsprotein A (HP0695, Spot 2_377) oder das Putative Neuraminy-Lactose -Bindungs-Protein HpaA (HP0410, Spots 4_121 und 4_1329) oder das 26kDa Antigen (HP1563, Spot 4_341), das als starkes Antigen bei der *Helicobacter*-Infektion bekannt ist, wurden weniger oft bzw. weniger intensiv durch Seren von Ulcus- verglichen mit Gastritispatienten erkannt.

Tabelle 11 zeigt die erkannte Antigenen und ihre Signalfrequenzen bezogen auf die Krankheitsgruppen Gastritis, Ulkus und Karzinom.

In folgenden Fällen wurden ähnliche Erkennungsmuster zwischen den Seren von sechs Krebspatienten und Seren von Ulcuspatienten festgestellt (Abbildungen 5C-D). Das metabolische Enzym Isocitrat-Dehydrogenase (HP0027, Hauptspot 2_492) und Fumarat-Reduktase (HP0192, Spot 2_17), ein Conserved hypothetical protein (HP1285, Spot 4_327), ein Vorläufer-Protein Hämolyisin-Sekretion (HP0175, Spot 4_249) und Elongationsfaktor EF-TU (HP1205, Spot 1_477) wurden durch mehr als die Hälfte der Seren von Ulkus- und Krebspatienten erkannt (Tabellen 12, 13 und 14). Da nur sechs Krebspatienten, die keine aktive *H. pylori*-Infektion zeigten, getestet wurden, ist die statistische Analyse für einen Vergleich von Seren dieser Gruppe mit Seren von der Gastritis- und der Ulcusgruppe nicht sehr aussagekräftig. Einige Unterschiede sind jedoch offensichtlich. In einigen Fällen war die Intensität der Antigenerkennung durch Seren von Krebspatienten stärker im Vergleich zu Seren von Ulcuspatienten, wie für Isocitrat-Dehydrogenase Icd Spot B499 und ein noch nicht identifiziertes Protein in Verbindung mit Icd durch Lokalisation in dem Gel (Spot 2_66 und 2_138) in Abbildung 5C und 5D, und zum Beispiel auch das Hypothetical-Protein (HP0305, Spot 4_276). Zusätzlich führten sowohl die Erkennung des metabolischen Enzyms Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (HP1104, Spot 2_35) als auch des Hydantoin-Utilisations-Protein A

(HP0695, Spot 2_377) zu einer weitaus höheren Signalfrequenz bei Seren von Krebspatienten im Vergleich zu Ulkus- oder Gastritispatienten. Auch ein konserviertes Hypothetical-Protein (HP1098, Spot 4_262) und das Protein aus der Außenmembran (HP1564, 4_202) wurden bei Krebspatienten mit einer höheren Signalfrequenz erkannt (Abbildung 5D).

Aufgrund der geringen Zahl der Patientenserum, die bis dahin getestet werden konnten, kann nur eine Tendenz abgeleitet werden, welche auf Antigene mögliche Antigenerkennungsmuster bei unterschiedlichen Krankheitssymptomen hinweist.

Tab. 11: Vergleich der 32 Proteine mit den höchsten Frequenzen in den einzelnen Krankheitsgruppen Gastritis, Ulkus, Karzinom (KGT : Kleingeltechnik, GGT: Großgeltechnik, ORF: Open reading frame, Sektoren A-F in GGT entsprechen 1_5_ in der Datenbank und in den Abbildungen) [G: Gastritis, U:Ulkus, Ca: Karzinom, Freq.: Frequenz]

| KGT | GGT | ORF | Antigene | G-Freq. | U-Freq. | Ca-Freq. |
|-----|----------|--------|--|---------|---------|----------|
| 87 | E53 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L7/L12 | 55,83 | 69,44 | 37,50 |
| 622 | B439 | HP0875 | Katalase | 43,33 | 56,94 | 52,08 |
| 80 | A390 | HP0010 | 60kDHitzeschock-Protein (GroEL) | 30,83 | 48,61 | 54,16 |
| 562 | D202 | HP1564 | Protein der Außenmembran | 11,67 | 29,17 | 50,00 |
| 437 | D322 | HP0073 | Urease A | 27,50 | 43,06 | 47,91 |
| 90 | A388 | HP0010 | 60kDHitzeschock-Protein (GroEL) | 32,50 | 44,44 | 45,83 |
| 77 | A194 | HP0010 | 60kDHitzeschock-Protein (GroEL) | 28,33 | 37,50 | 45,83 |
| 513 | B66+B138 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase mit assoz. Protein | 8,33 | 8,33 | 45,83 |
| 692 | B303 | HP1350 | Protease | 20,83 | 44,44 | 20,83 |
| 700 | B320 | HP1152 | Teilchen-Protein Ffh | 12,50 | 44,44 | 18,75 |
| 567 | D318 | HP0318 | Hypothetical-Protein | 11,67 | 13,89 | 41,66 |
| 78 | D276 | HP0305 | Hypothetical-Protein | 12,50 | 31,94 | 41,66 |
| 215 | A192 | HP0010 | 60kDHitzeschock-Protein (GroEL) | 18,33 | 38,89 | 29,16 |
| 259 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 38,33 | 34,72 | 6,25 |
| 301 | A323 | HP0072 | Urease B | 17,50 | 34,72 | 8,33 |
| 92 | A343 | HP0072 | Urease B | 23,33 | 36,11 | 33,33 |
| 273 | A325 | HP0072 | Urease B | 18,33 | 33,33 | 25,00 |
| 276 | - | - | nicht identifiziert | 25,00 | 33,33 | 20,83 |
| 552 | D132 | HP0410 | Putative Neuraminyllactose-Bindung (hpaA) | 17,50 | 15,28 | 33,33 |
| 109 | A477 | HP1205 | Elongationsfaktor (EF-TU) | 9,17 | 31,94 | 22,91 |
| 140 | E27 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L5/L12 | 27,50 | 27,78 | 4,16 |
| 327 | A424 | HP0599 | Vorläufer-Protein Hämolyse-Sekretion | 25,83 | 27,78 | 27,08 |
| 694 | - | - | nicht identifiziert | 13,33 | 27,78 | 18,75 |
| 820 | B492 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 7,50 | 4,12 | 29,16 |
| 290 | A119 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 18,33 | 16,67 | 25,00 |
| 745 | D327 | HP1285 | Conversed hypothetical protein | 15,00 | 11,11 | 20,83 |
| 704 | B465 | HP1133 | ATP-Synthase G | 5,83 | 20,83 | 8,33 |
| 147 | A461 | HP1293 | DNA-abhängige RNA Polymerase A | 20,00 | 11,11 | 18,75 |
| 171 | D262 | HP1098 | Hypothetical-Protein | 19,17 | 4,17 | 18,75 |
| 187 | A396 | - | - | 15,00 | 15,28 | 18,75 |
| 699 | D249 | HP0175 | Vorläufer-Protein Hämolyse-Sekretion | 4,17 | 18,06 | 8,33 |
| 803 | D341 | HP1563 | 26kDa Antigen | 5,83 | 8,33 | 6,25 |

Tabelle 12 verzeichnet die arithmetischen Mittelwerte der Intensität der Antigenerkennung statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Proteinspots in den Seren der einzelnen Krankheitsgruppen.

Tab. 12: Relative Häufigkeiten, Frequenzen und arithmetische Mittelwerte der Intensitäten statistisch signifikanter Proteinspots bezogen auf die Krankheitsgruppen

(KGT : Kleingeltechnik, GGT: Großgeltechnik, ORF: Open reading frame, Sektoren A-F in GGT entsprechen 1_5_ in der Datenbank und in den Abbildungen) [G: Gastritis, U:Ulkus, Ca: Karzinom, Freq.: Frequenz aMW: arithmetischer Mittelwert der Intensität]

| KGT | GGT | ORF | Antigene | Häufigkeit (%) | | | Frequenz | | | aMW | | |
|-----|----------|--------|--|----------------|-----|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | G | U | C | G | U | C | G | U | C |
| 459 | B511 | HP0294 | Aliphatische Amidase | 12 | 22 | 50 | 4,2 | 2,8 | 15 | 0,2 | 0,1 | 0,6 |
| 270 | B19 | HP0192 | Fumarat-Reduktase | 20 | 55 | 50 | 13 | 24 | 23 | 0,5 | 0,9 | 0,9 |
| 125 | B2 | HP0779 | Akoniat-Hydratase 2 | 13 | 33 | 67 | 7,5 | 5,6 | 23 | 0,3 | 0,2 | 0,9 |
| 487 | B497 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 20 | 55 | 50 | 7,5 | 7,0 | 27 | 0,3 | 0,3 | 1,1 |
| 489 | B496 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 20 | 55 | 50 | 7,6 | 6,9 | 27 | 0,3 | 0,3 | 1,1 |
| 513 | B66+B138 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase mit assoziiertem Protein | 26 | 66 | 83 | 8,3 | 8,3 | 46 | 0,3 | 0,3 | 1,8 |
| 812 | B499 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 20 | 55 | 67 | 7,5 | 6,9 | 13 | 0,3 | 0,3 | 1,8 |
| 820 | B499 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 20 | 77 | 67 | 7,5 | 4,1 | 29 | 0,3 | 0,3 | 1,2 |
| 120 | A29 | HP1293 | DNA-abhängige RNA-Polymerase A | 0,0 | 0,0 | 33 | 0,0 | 1,4 | 19 | 0,0 | 0,1 | 0,1 |
| 70 | E44 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L7/L12 | 40 | 77 | 0,0 | 20 | 46 | 0,0 | 0,8 | 1,8 | 0,0 |
| 194 | E35 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L7/L12 | 33 | 66 | 16 | 4,2 | 8,3 | 2,1 | 0,2 | 0,3 | 0,1 |
| 74 | A177 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 20 | 44 | 50 | 9,2 | 24 | 21 | 0,4 | 0,9 | 0,8 |
| 215 | A192 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 53 | 88 | 83 | 18 | 39 | 29 | 0,7 | 1,6 | 1,8 |
| 290 | A119 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 46 | 66 | 83 | 18 | 17 | 25 | 0,7 | 0,7 | 1,0 |
| 700 | B320 | HP1152 | Teilchen-Protein Ffh | 33 | 77 | 50 | 13 | 44 | 19 | 0,5 | 1,8 | 0,8 |
| 186 | C84 | HP0794 | ATP-abhängige Protease | 0,0 | 11 | 33 | 0,0 | 1,4 | 4,2 | 0,0 | 0,1 | 0,2 |
| 499 | D121 | HP0410 | Putative Neuraminy-Lactose-Bindung | 6,0 | 0,0 | 33 | 0,8 | 0,0 | 6,3 | 0,1 | 0,0 | 0,3 |
| 704 | B465 | HP1133 | ATP-Synthase G | 40 | 88 | 17 | 5,8 | 21 | 8,3 | 0,2 | 0,8 | 0,3 |
| 523 | B35 | HP1104 | Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase | 6,0 | 22 | 67 | 5,0 | 2,8 | 40 | 0,2 | 0,1 | 1,6 |
| 699 | D249 | HP0175 | Hypothetical-Sekretions-Protein | 13 | 66 | 50 | 4,2 | 18 | 8,3 | 0,2 | 0,7 | 0,3 |
| 501 | - | - | nicht identifiziert | 6,0 | 0,0 | 33 | 0,8 | 0,0 | 21 | 0,1 | 0,0 | 0,8 |
| 668 | - | - | nicht identifiziert | 6,0 | 22 | 50 | 0,8 | 2,8 | 8,3 | 0,1 | 0,1 | 0,3 |
| 78 | - | - | nicht identifiziert | 46 | 88 | 50 | 13 | 32 | 42 | 0,1 | 1,3 | 1,7 |

Die Signalfrequenz spiegelt sowohl die Häufigkeit als auch die Intensität von Spots in Kombination wider und kann zum Vergleich der Seren von *H. pylori*-positiven und – negativen Patienten herangezogen werden. Unter Berücksichtigung der Signifikanzberechnung zeigt die Auswertung (Tabelle 11 und Tabelle 12) folgende Ergebnisse:

1. Signifikant häufiger bei Ulkus- gegenüber Gastritisgruppen sind die Proteinspots Fumarat Reduktase (HP0192), Akoniat-Hydratase 2 (HP0779), Proteinspots der Isocitrat-Dehydrogenase-Seriengruppe, 50S ribosomales Protein L7/L12 (HP1199), ATP-Synthase G (HP1133) und Hypothetical-Sekretions-Protein (HP0175).
2. Der arithmetische Mittelwert der Intensität des 50S ribosomales Protein L7/L12 (HP1199, KGT Spot 70), GroEL (HP0010), Teilchen-Protein Ffh (HP1152), ATP-Synthase G (HP1133, KGT Spot 704) und Hypothetical-Sekretions-Protein (HP0175) ist größer bei Ulkus- als bei Gastritis-Seren.
3. Der arithmetische Mittelwert der Intensität bei GroEL-KGT Spot 74 und Teilchen-Protein Ffh, ATP-Synthase G und Hypothetical-Sekretions-Protein ist größer bei Ulkusseren als bei Seren von Karzinomen.
4. DNA-abhängige RNA-Polymerasen wurden durch Gastritis- und Ulkusseren nicht erkannt. Die ATP-abhängige Protease fehlte bei Seren der Gastritisgruppe.
5. Die Putative Neuraminyll-Lactose-Bindung, die DNA-abhängige RNA-Polymerase und der nicht identifizierbare KGT Spot 501 wurde durch Seren der Ulkusgruppe nicht erkannt.
6. Die Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase hatte bei Karzinomseren einen höheren arithmetischen Mittelwert der Intensität gegenüber Ulkus- und Gastritisseren.

5.5.1 Antigene mit größerer Frequenzstärke in Karzinomseren

Tabelle 13 zeigt *H. pylori*-Antigene, die bei Karzinomseren mit größerer Frequenzstärke auftraten als bei Gastritis- und Ulkusseren. 21 der Antigene wurden nur durch Seren der Karzinompatienten erkannt, wenn auch von niedriger Frequenz.

Die übrigen 30 erkannten Antigene traten bei Gastritis- und/oder Ulkusseren ebenfalls auf, jedoch mit niedrigerer Frequenz als bei der Karzinomgruppe. Weiterhin wurde festgestellt, dass mehrere Spots eines identischen Proteins (wie Isocitrat-Dehydrogenase u.a.) mit unterschiedlicher Frequenz auftraten: So gehören alle Spots 467, 533, 820, 821 der Isocitrat-Dehydrogenase-Gruppe an, wiesen aber unterschiedliche Profile auf.

Tab. 13: *H. pylori*-Antigene mit größerer Frequenzstärke bei Karzinom-Seren mit Vergleich zu den Gastritis- und Ulkusgruppen

(KGT : Kleingeltechnik, GGT: Großgeltechnik, ORF: Open reading frame, Sektoren A-F in GGT entsprechen 1_5_ in der Datenbank und in den Abbildungen) [Ca: Karzinom, G: Gastritis, U: Ulcus, Freq.: Frequenz].

| KGT | GGT | ORF | Antigene | Ca-Freq. | G-Freq. | U-Freq. |
|-----|----------|--------|---|----------|---------|---------|
| 94 | A327 | - | nicht identifiziert | 2,08 | 0 | 0 |
| 97 | D132 | HP0410 | Putative Neuraminyll-Lactose-Bindung | 16,66 | 1,67 | 1,39 |
| 101 | - | - | nicht identifiziert | 16,66 | 0 | 0 |
| 114 | - | - | nicht identifiziert | 16,66 | 0 | 0 |
| 118 | - | - | nicht identifiziert | 16,66 | 0 | 0 |
| 120 | A29 | HP1293 | DNA-abhängige RNA-Polymerase A | 18,75 | 0 | 1,39 |
| 123 | E29 | ? | Thioredoxin | 2,08 | 0 | 0 |
| 125 | B2 | HP0779 | Akonitat-Hydratase 2 | 22,91 | 7,50 | 5,56 |
| 138 | B2 | HP0779 | Akonitat-Hydratase 2 | 18,75 | 7,50 | 5,56 |
| 142 | A461 | HP1293 | DNA-abhängige RNA-Polymerase A | 16,66 | 0 | 0 |
| 156 | - | - | nicht identifiziert | 16,66 | 0 | 5,56 |
| 164 | A177 | HP0010 | 60kD Hitzeschock-Protein (GroEL) | 18,75 | 4,17 | 5,56 |
| 169 | - | - | nicht identifiziert | 12,50 | 5 | 12,05 |
| 178 | A271 | HP1195 | Elongation-Faktor G (EF-G) | 4,16 | 0 | 0 |
| 190 | - | - | nicht identifiziert | 2,08 | 0 | 0 |
| 191 | - | - | nicht identifiziert | 8,33 | 0 | 0 |
| 218 | A277 | ? | Akonitat-Hydratase 2 | 16,66 | 0,83 | 0 |
| 222 | - | - | nicht identifiziert | 4,16 | 0 | 0 |
| 232 | - | - | nicht identifiziert | 2,08 | 0 | 0 |
| 304 | C197 | ? | Superoxid-Dismutase | 4,16 | 0 | 0 |
| 309 | - | - | nicht identifiziert | 2,08 | 0 | 0 |
| 320 | B2 | HP0779 | Akonitat-Hydratase 2 | 16,66 | 0 | 0 |
| 348 | - | - | nicht identifiziert | 10,41 | 1,67 | 4,17 |
| 350 | - | - | nicht identifiziert | 27,08 | 10 | 5,56 |
| 352 | B2 | HP0779 | Akonitat-Hydratase 2 | 16,66 | 0 | 0 |
| 357 | - | - | nicht identifiziert | 2,08 | 0 | 0 |
| 368 | B2 | HP0779 | Akonitat-Hydratase 2 | 16,66 | 0,83 | 0 |
| 382 | B377 | HP0695 | Hydantoin-Utilisations-Protein A | 29,16 | 13,33 | 0 |
| 385 | B377 | HP0695 | Hydantoin-Utilisations-Protein A | 12,50 | 2,50 | 0 |
| 411 | - | - | nicht identifiziert | 10,41 | 2,50 | 0 |
| 430 | B377 | HP0695 | Hydantoin-Utilisations-Protein A | 2,08 | 0 | 0 |
| 467 | B492 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 20,83 | 5,83 | 4,17 |
| 471 | - | - | nicht identifiziert | 4,16 | 0 | 0 |
| 487 | B497 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 27,08 | 7,50 | 6,96 |
| 489 | B496 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 27,08 | 7,56 | 6,94 |
| 496 | - | - | nicht identifiziert | 14,58 | 5,00 | 2,78 |
| 500 | - | - | nicht identifiziert | 4,16 | 0 | 0 |
| 501 | - | - | nicht identifiziert | 20,83 | 0,83 | 0 |
| 513 | B66+B138 | ? | Isocitrat-Dehydrogenase mit assoziiertem Protein | 45,83 | 8,33 | 8,33 |
| 533 | B210 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 16,66 | 0 | 0 |
| 544 | F40 | ? | Hypothetical hit-like Protein | 2,08 | 0 | 0 |
| 552 | D132 | HP0410 | Putative Neuraminyll-Lactose (hpaA) | 33,33 | 17,50 | 15,28 |
| 562 | D202 | HP1164 | Protein der Außenmembran | 50,00 | 11,67 | 29,17 |
| 566 | D314 | HP1582 | Pyridoxal-Phosphat-Protein | 41,66 | 10,00 | 13,89 |
| 567 | D262 | HP0318 | Hypothetical-Sekretions-Protein | 41,66 | 10,00 | 13,89 |
| 585 | D313 | HP1562 | Iron(III) ABC Transporter (Perpl, Iron-Bindung-Protein) | 12,50 | 0,83 | 0 |

| | | | | | | |
|-----|------|--------|---|-------|------|------|
| 602 | D313 | HP1562 | Iron(III) ABC Transporter (Perpl. Iron-Bindung-Protein) | 20,83 | 4,17 | 4,17 |
| 670 | D200 | ? | Carbonic-Anhydrase | 16,66 | 0,83 | 0 |
| 711 | F68 | HP0514 | 50S ribosomales Protein L9 | 16,66 | 0,83 | 1,39 |
| 820 | B492 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 29,16 | 7,50 | 9,72 |
| 821 | B499 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 20,83 | 7,50 | 4,12 |

5.5.2 Statistisch auffälligste Antigene bezüglich der Frequenzstärke

Es wurden 8 Spots detektiert und identifiziert, die sich aus der Isocitrat-Dehydrogenase herleiten. Bei der Analyse dieser Spots waren die Blotnummern KGT 487 und KGT 489[entsprechend 2_497 und 2_496 in der Datenbank] in jeder Hinsicht auffällig (Tabelle 14). Sie waren nur bei *H. pylori*-Positiven vertreten, in der Karzinomgruppe besonders frequenzstark, dagegen in der Ulkus- und der Gastritisgruppe nur schwach zu erkennen.

Tab. 14: Statistisch signifikanteste Spots mit Frequenzangaben in verschiedenen Krankheitsgruppen (KGT : Kleingeltechnik, GGT: Großgeltechnik, ORF: Open reading frame, Sektoren A-F in GGT entsprechen 1_5_ in der Datenbank und in den Abbildungen) [Freq.: Frequenz, *H. p.*: *H. pylori*, pos.: positiv, neg.: negativ, G: Gastritis, U: Ulkus, Ca: Karzinom].

| KGT | GGT | ORF | Antigene | Freq <i>H. p.</i> -pos. Seren | Freq <i>H. p.</i> -neg. Seren | G- Freq. | U- Freq. | Ca- Freq. |
|-----|------|--------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|--------------|
| 487 | B497 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 7,29 | 0 | 7,50 | 6,94 | 27,08 |
| 489 | B496 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 7,29 | 0 | 7,50 | 6,94 | 27,08 |

5.6 Untersuchungen von Serumpools

Aus mehreren gleichen Gruppenserum wurden 10 Pools zusammengestellt und geblottet. Hierzu wurden erstens drei Serumpools jeweils aus bis zu fünf Seren von *H. pylori*-positiven, *H. pylori*-negativen und eradizierten Seren gemischt und geblottet. Zweitens wurden sechs nicht ähnliche Mischseren hergestellt, ebenfalls geblottet und auf neue Antigene überprüft. Zweck dieses Tests war, einen Vergleich zwischen Seren

ähnlicher Herkunft sowie die Aussagekraft von Blots aus Pool- gegenüber Einzelseren zu überprüfen.

Einige Proteine wurden selten, aber mit starker Intensität durch Pools und die Einzelseren erkannt. Der nicht identifizierbare Spot 142 war zweimal in den Pools und einmal in der Karzinomgruppe vertreten. Der noch nicht identifizierte Spot 156 war in den Pools zweimal, durch Ulkus- und Karzinomseren je einmal erkennbar. Der ebenfalls nicht identifizierte Spot 173 fand sich zweimal bei Gastritis und einmal bei Ulkus. Der Elongationsfaktor (EF-Tu) und das Succinyl-CoA: 3-ketoacid-Coenzym A (Transferase A) waren bei Gastritis, Ulkus und Karzinom zu erkennen.

Tabelle 15 zeigt mit Poolbezeichnung und Blotnummern die Herkunftseigenschaften der Pools, die Anzahlen der gebloteten Seren (n) und die Anzahlen der erkannten Spots (n).

Tab. 15: Die geblotteten Pools und ihre Eigenschaften

| Poolbezeichnung (Blots) | Herkunftsgruppe | Anzahl der Seren (n) | Anzahl der Spots (n) |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 8 Pool 0 | Mischserum | 2 | 43 |
| 9 Pool 1 | Mischserum | 4 | 19 |
| 10 Pool 2 | <i>H. pylori</i> -negativ | 5 | 18 |
| 11 Pool 3 | <i>H. pylori</i> -positiv | 3 | 148 |
| 12 Pool 4 | <i>H. pylori</i> eradiziert | 2 | 38 |
| 22 Pool 4A | Mischserum | 4 | 128 |
| 23 Pool 5 | Mischserum | 3 | 109 |
| 25 Pool 6 | <i>H. pylori</i> -eradiziert | 9 | 125 |
| 26 Pool 7 | Mischserum | 5 | 65 |
| 27 Pool 8 | Mischserum | 3 | 69 |

Die durch Serumpools erkannten Proteinspots waren zu 72% auch bei den Blots der Einzelseren existent. Es konnten auch einige neue Spots detektiert, aber nicht identifiziert werden. Sowohl bei den Mischseren als auch bei *Helicobacter*-eradizierten Seren waren 75% der Proteinspots äußerst frequenzstark. Dagegen zeigten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen *H. pylori*-negativer Einzelseren die auf mehreren Blots durch *H. pylori*-negative Poolseren erkannten Proteinspots nur schwache Frequenzintensitäten.

6 DISKUSSION

Die Bedeutung des *Helicobacter pylori* als wichtiger humanpathogener Erreger wird unumstritten anerkannt. In einer Vielzahl von Arbeiten wurde die enge Korrelation zwischen einer *H. pylori*-Besiedlung der Magenschleimhaut und der Entwicklung von chronischen Gastritiden, gastralen und duodenalen Ulzerationen, MALT (Mucosa-associated lymphoid tissue) sowie der möglichen Entstehung eines Magenkarzinoms beschrieben (ELDRIGE et al., 1984; FORMAN et al., 1991; GOODWIN et al., 1986; MARSHALL, 1986; NOMURA et al., 1991; PARSONNET et al., 1991).

In dieser Arbeit wurden bei Patienten mit den jeweils diagnostizierten gastrointestinalen Erkrankungen mittels Immunoblot (Westernblot)-Analysen die spezifischen Immunantworten gegen *H. pylori* untersucht. Hierbei konnte im Serum von Patienten mit *H. pylori*-Infektion durch Identifikation und Charakterisierung von Proteinen unterschiedlich starke Immunantworten gegen Antigene unterschiedlicher Intensitäten nachgewiesen werden.

6.1 Bedeutung der Serodiagnostik

Die serologische Diagnostik ist grundsätzlich eine Möglichkeit zur Entdeckung einer *Helicobacter pylori*-Infektion. Andere Optionen sind die Biopsieentnahme für die histologische Untersuchung, der Urease-Schnelltest, der 13-C-Atemtest und die Speicheldiagnostik (CHRISTIE et al., 1996). Die serologische Diagnostik soll die Anforderungen einer Screeningmethode erfüllen (BLECKER et al., 1995), um bei häufig symptomlosen Infektionen mit *Helicobacter pylori* eine karzinompräventive Eradikationstherapie durchzuführen (FORMAN, 1992; MALFERTHEINER et al., 1997). Auch als Kontrolluntersuchung nach einer Eradikationstherapie ist die serologische Diagnostik einsetzbar (CUTLER et al., 1996; SAFE et al., 1993). Die Zweidimensionale

Gelelektrophorese-Immunoblot-Analyse erlaubte uns, in dieser Studie neue immunogene Antigene zu erkennen.

Die *Helicobacter pylori*-Infektion löst nicht nur eine lokale sondern in aller Regel auch eine humorale Immunantwort aus. Daher ist die Entwicklung serologischer Nachweisverfahren auf *H. pylori*-Infektionen von maßgebender Bedeutung.

6.2 Bedeutung der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Als die Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen der komplexer Proteingemische wurde in dieser Studie die Zweidimensionale Gelelektrophorese zur Auftrennung der *Helicobacter pylori*-Proteine angewendet.

Die zweidimensionale-Elektrophorese ist derzeit die einzige Technik, die eine Trennung von etwa 10 000 Proteinkomponenten ermöglicht. Bei der Nutzung dieser Methode sind allerdings Vor- und Nachteile in Betracht zu ziehen. Die Zweidimensionale-Gelelektrophorese stellt die Kombination zweier komplementärer, hocheffizienter Trennprinzipien (IEF und SDS-PAGE) dar. Von Vorteil sind die parallele und schnelle Durchführbarkeit und die universelle Anwendungsmöglichkeit.

Der Nachteil beziehungsweise die Einschränkung dieser Methode besteht darin, dass besonders schwer lösliche Proteine nicht detektiert werden. So erhält man keine Information über Proteine mit einem isoelektrischen Punkt in extremen pH-Bereichen (< pH 2 und > pH 9). Ebenso verhält es sich mit Proteinen mit einem Molekulargewicht von weniger als 5 000 Da (LOHAUS et al., 1998).

Während die lokale Immunreaktion durch eine ausgeprägte leukozytäre Durchsetzung des foveolären Epithels gekennzeichnet ist, werden bei der humoralen Immunreaktion vor allem IgG- und IgA-Antikörper gegen die bakteriellen Antigene gebildet (NEWELL und STACEY, 1989). Als eine sehr genaue Antikörper-Nachweismethode gilt das Immunoblot (Westernblot) -Verfahren.

Von den 1800 Proteinspots, die durch Silberfärbung detektiert wurden, reagierten 379 Spots mit den getesteten Patientenseren. Unter den Proteinen, die sehr häufig durch *H. pylori*-positive Seren erkannt wurden, sind 9 in dieser Studie identifiziert und 23 bereits durch vorangegangene eigene Studien und durch andere 2-DE-Analysen bestätigt (JUNGBLUT und BUMANN et al., 2000; McATEE und LIM et al., 1998).

Einschränkungen der Detektierbarkeit bestanden hauptsächlich in der Grenze der allgemeinen und technischen Annäherung in bezug auf genetische Variationen, Affinität von Antikörpern, Übereinstimmung der Epitopen oder membrangebundenen Antigenen und auf genaue Identifizierung von verschiedene Seren erprobte erkannte Antigene.

6.3 *Helicobacter pylori*-spezifische Antigene

Um in Frage kommende *H. pylori*-Antigene für Diagnose und Therapie zu charakterisieren, haben wir systematisch die Differenzen in den *Helicobacter*-2DE-Antigenerkennungsprofilen des Stammes 26695 durch Verwendung von Patientenseren mit unterschiedlichen Magenerkrankungen analysiert. Von 1800 durch Silberfärbung detektierten Proteinspots dieses Stammes reagierten 310 Spots mit *H. pylori*-positiven Seren. 42 Proteinspezies einschließlich 32 Proteinen konnten als Antigene mit einer Signalfrequenz >10 identifiziert werden. Von diesen 32 Proteinen, die am häufigsten durch *H. pylori*-positive Seren erkannt wurden, wurden 9 als neu vorkommend identifiziert, 23 wurden durch andere Studien und 2-DE-Analysen bestätigt (JUNGBLUT et al. 2000; McATEE et al. 1998; KIMMEL et al. 2000).

Da *H. pylori*-Stämme einen hohen Grad an Variabilität zeigen, muss jeder Ansatz, Antigene für Diagnose und Vakzination zu definieren, sich mit diesem Problem befassen. Durch 2-DE-Immunoblot-Analyse werden in dieser Studie neue immunogene Antigene erkennbar. Ein weiterer Vorteil der 2-DE-Elektrophorese ist die Bewertung aller Proteinspezies nach ihrer Pathogenität und die klare Trennung von Proteinen mit hohem pI (Isoelektrischer Punkt). So wurden mehrere Antigene im basischem Bereich der Gele detektiert, wie zum Beispiel das hypothetische Protein HP0305 (pI=9,45), das Protein der Außenmembran HP1564 (pI=8,83), Cag 16 (HP0537) (pI=9,7) oder die

Protease HP1350 (pI=9,45) durch mehr als die Hälfte der *H. pylori*-positiven Patientenseren erkannt.

Etliche, sehr reichlich versehene Proteine des *Helicobacter*-Proteoms wurden durch *H. pylori*-negative Seren erkannt. Für einige dieser Antigene sind korrespondierende Proteine schon von anderen Analysen bakterieller Proteome her bekannt (O'CONNOR et al. 1997; TONELLA et al. 1998). Sie können folglich als kreuzreaktive Antigene anderer bakterieller Infektionen angesehen werden: 50S ribosomales Protein L7/L12, Katalase und GroEL als Beispiele. Interessanterweise wurde eine Proteinspezies des 50S ribosomalen Proteins L7/L12 (Spot 5_44) nur durch positive Seren erkannt und stellt möglicherweise eine Veränderung nach der Übersetzungsphase des Proteins dar (wie in der Nucleotid-Sequenz in der m-RNS, in Form einer Aminosäuren-Sequenz bei der Proteinsynthese), wie für ein anderes ribosomales Protein S1 aus Salmonellen-Stämmen beschrieben wurde (ADAMS et al. 1999). Im übrigen wurden die Ureasen A und B auch durch Antikörper von *H. pylori*-negativen Patienten erkannt, korrelierend mit der Beobachtung von geringer Spezifität beim *Helicobacter*-Nachweis in diagnostischen Analysen, die rekombinante Urease enthalten (WIDMER et al. 1999). Gegenwärtig ist das Hauptproblem sowohl kommerzieller als auch wissenschaftlicher Analysen hinsichtlich des Nachweises von *H. pylori* die verhältnismäßig geringe Korrelation mit der Krankheit und die geringe Spezifität (JOHANSEN et al., 1995; WIDMER et al., 1999; NISHIZONO et al., 1998).

Wir haben sieben Proteine identifiziert, die durch Seren von Patienten mit aktiver *H. pylori*-Infektion detektiert wurden: Trigger-Faktor HP0795, Clp Protein HP0264, Cag 26 (HP0547), die vorher erwähnte *H. p.* predicted coding region HP0231, das 30S ribosomale Protein S5 (HP1302), die Serin-Protease HtrA (HP1019) und Cag 3 (HP0522), wobei die letzten vier neue spezifisch erkannte Antigene zu sein scheinen. Diese Antigene wurden durch Seren von *H. pylori*-positiven Patienten in Kombination mit mindestens drei Antigenen folgender Proteine erkannt: Fumarat-Reduktase (HP0192), welches kürzlich identifiziert wurde, und ATP-Synthase A (HP1134) oder DnaK-Protein HSP 70 (HP0109), die auch in früheren Studien detektiert wurden (KIMMEL et al., 2000; McATEE et al., 1998). Alle genannten Proteine sind unter den 150 reichhaltigsten Proteinspezies von *H. pylori* vorhanden (JUNGBLUT et al., 2000) und mögen deshalb als sehr immunogene Faktoren bei der Entwicklung einer

diagnostischen Analyse darstellen, da sie wahrscheinlich mit einer Vielzahl von *H. pylori*-Stämmen reagieren können. Sie werden zur Zeit durch Verwendung einer größeren Anzahl von Patienten und zahlreicher Stämme getestet.

Offenbar liegen bei *H. pylori*-positiven Patienten höhere Antikörpertiter vor als bei *H. pylori*-negativen. Diese Tatsache reflektiert eine statistisch höhere Erscheinung und Intensität mancher dominanten Proteinspots bei der *Helicobacter*-positiven Gruppe.

Es zeigte sich, dass mehrere, sehr reichhaltige Proteine von *Helicobacter*-Proteomen durch *H. pylori*-negative Seren erkannt wurden. Manche dieser Proteine entsprechen den Proteinen anderer bakterieller Proteom-Analysen (O'CONNOR und FARRIS et al., 1997; TONELLA und WALSH et al., 1998). Mögliche kreuzreaktive Antigene anderer bakterieller Infektionen sind: 50s ribosomales Protein L77L12, Katalase und GroEL. Des weiteren wurden Urease A und B durch Antikörper von *H. pylori*-negativen Patienten erkannt und korrelierten mit solchen von niedriger Spezifität der *Helicobacter*-Detektion in diagnostischen Assays, die Urease-Rekombinante enthielten. Es wurden sechs Proteine identifiziert, die nur durch Seren von Patienten mit aktiver *H. pylori*-Infektion erkannt wurden: Trigger-Faktor (HP0795), Stress-Protein ClpB (HP0364), Cag 26 (HP0547), predicted coding region (HP0231), Serin-Protease HtrA (HP1019) und Cag 3 (HP0522). Die letzten drei genannten Proteine scheinen neue spezifische Antigene für *H. pylori* zu sein.

Im Gegensatz zu anderen Studien konnten in dieser Arbeit die Antigene des Cag 26 ermittelt werden. Sie wurden in 11 der 24 positiven Patienten erkannt (McATEE et al., 1998; KIMMEL et al., 2000).

Die Serin-Protease (HP1019), das 50S ribosomales Protein (HP1307) und die nicht identifizierbaren Spots 129, 145, 207, 209, 294, 639 und 649 waren für *Helicobacter* spezifisch. Außerdem waren das Cag A, die ATPase B, die Fumarat-Reduktase, das Penicillin-Toleranz-Protein und einige nicht identifizierte Spotproteine bei den *H. pylori*-negativen Seren jeweils nur einmal vorhanden. Dennoch waren viele weitverbreitete Proteine bei den *Helicobacter*-Patienten immunogen. Um genauere Aussagen zur *Helicobacter*-Spezifität einiger Antigene oder Proteinspots zu machen, bedarf es größerer Gruppen von Patientenserum.

6.4 *Helicobacter pylori*-Antigene und Bezug zur Krankheit

Wünschenswert wäre das Auffinden serologischer Marker, um die verschiedenen Ausprägungen gastrischer Erkrankungen indizieren zu können. Bisher ist es nicht gelungen, solche eindeutigen Marker zu bestimmen, sei es wegen der begrenzten Auflösung der ein-dimensionalen Proteinanalyse (NILSSON et al., 1997; FAULDE et al., 1992; FAULDE et al., 1993; KLAMAAS et al., 1996 und wiederholt in ZEVERING et al., 1999) oder aufgrund begrenzter Anzahlen von Proben (KIMMEL et al., 2000).

In unserer Studie wurde die Mehrzahl der Antigene mit größeren Intensitäten durch Seren von Ulkuspatienten erkannt worden zu sein, verglichen mit Seren von Gastritispatienten. Dies könnte auf persistierende Entzündungen sowie Gewebsschäden zurückzuführen sein, die zu erhöhter Antigenpräsentation bei der Entstehung eines Ulkus führt. Es gibt auch Antigene, die nicht nur aufgrund der allgemeinen Verstärkung der Antigenerkennung in Ulkus erkannt werden zu sein scheinen.

Bei den Krankheitsmanifestationen dominierte das Bild der *H. pylori*-assoziierten Gastritis, die histopathologisch bei 16, und das der unspezifischen Gastritis bei 10 von 60 Patienten diagnostiziert wurde. 10 weitere Patienten wiesen eine Ulkuskrankheit auf. Die Krankheitsgruppen gastrale Dysplasie und Metaplasie waren nur mit wenigen Patienten vertreten.

Im Vergleich zu Gastritis waren sowohl die Anzahl der Proteinerkennung als auch deren Intensitäten bei Ulkus- und Karzinompatienten deutlich erhöht.

Neben den bereits genannten Antigenen, die auch von *H. pylori*-negativen Seren dieser Studie als Hypothetical-Sekretions-Protein HP1098, das Protein der Außenmembran HP1564 oder als Pyridoxal-Phosphat-Protein J HP1582 erkannt wurden, bedürfen diese Antigene der weiteren Erforschung mit Hilfe größerer Anzahlen von *H. pylori*-positiven und *H. pylori*-negativen Krebspatienten.

Der Stellenwert der Isocitrat-Dehydrogenase ist bei der Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich der statistisch signifikanten Proteine von entscheidender Bedeutung. Die Spots 513, 812 und 820 der Isocitrat-Dehydrogenase-Gruppe traten bei der Pathologie signifikant häufiger und intensiver (d.h. frequenzstärker) bei Karzinompatienten auf. Die Spots 487 und 489 derselben Reihe sind nur bei Positivseren aufgetreten und haben eine größere Intensität, wie die übrigen Spots dieser Serie, bei den Karzinomseren. Isocitrat dient einigen Bakterien und Pflanzen der Umsetzung bei Energiebedarf.

Die geringe Frequenz von Cag A bei Karzinompatienten dürfte auf die reduzierten Antikörpertiter zurückzuführen sein, da die zunehmende Ausdehnung einer intestinalen Metaplasie, die sich in der Übertrittsphase zu einem fortgeschrittenen Karzinom befindet, langfristig kein ideales Milieu für das Wachstum des *Helicobacter pylori* gewährleisten kann. Dafür spricht, dass die in dieser Studie erfassten Karzinompatienten nicht eindeutig *Helicobacter*-positiv waren.

Das Neutrophil-activating protein (NapA), das in einer Studie (KIMMEL et al., 2000) das Hauptantigen darstellte, wurde in der Studie nur sehr selten erkannt.

Das 50S ribosomale Protein L5/L12 mit Spots 70 und 194 ist sehr häufig und intensiv bei Ulkuspatienten erkannt worden, obwohl es sich in der Silberfärbung von *Helicobacter pylori* 26695 als sehr kleiner Spot darstellte. Der Hauptspot 87 dieses Antigens kam jedoch häufig sowohl bei den *H. pylori*-positiven als auch *H. pylori*-negativen Gruppen vor. Diese Tatsache könnte auf die Präsenz spezifischer Stämme bei Ulkuspatienten hinweisen.

Die zentral intermediären metabolischen Enzyme wie Isocitrat-Dehydrogenase und Akonitat-Hydratase hatten größere Frequenzen bei Karzinompatienten als bei Patienten der anderen Krankheitsgruppen. Das ABC transportierende Iron (III) kann eine zunehmende Bedeutung hinsichtlich des Metabolismus der Tumorzelle gewinnen.

Die Superoxid-Dismutase trat, trotz der schwachen Frequenz, nur bei Karzinompatienten auf. Superoxid-Dismutasen (SOD) sind Enzyme, welche die Umwandlung zweier Superoxidradikale in Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff katalysieren. Sie sind Teil eines Schutzsystems gegenüber endogen

gebildeten toxischen Sauerstoffmetaboliten (BANNISTER et al., 1987). Superoxid-Dismutase wird auch von *Helicobacter pylori* exprimiert (LIOR et al., 1985). Es existiert unter anderem die Expression einer FeSOD von *H. pylori* (EVANS et al., 1993). Ob hierbei eine gleichzeitige Assoziation mit Iron (III) vorliegt, ist nicht geklärt.

Eine signifikante Beziehung zwischen *Helicobacter-pylori*-Seropositivität und Magenkarzinom konnte bisher nicht nachgewiesen werden (SEIFERT, 1996). Eine *Helicobacter-pylori*-Infektion kann jedoch über eine chronische Gastritis mit Immunoglobulinantwort zu Atrophie, intestinaler Metaplasie und zur Dysplasie als Vorstufe des Magenkarzinoms (CHO et al., 1994; CLARKSON et al., 1993). Somit besteht eine Assoziation der *Helicobacter-pylori*-Infektion zu einem gesteigerten Risiko eines Magenkarzinoms (ASAKA et al., 1994; FUKUDA et al., 1995; KIKUCHI et al., 1995; HUANG et al., 1998).

Die Assoziation einer *H. pylori*-Infektion zur Ulkuserkrankung ist enger als jene zwischen *H. pylori* und Karzinom (DIXON, 1993; GORMALLY et al., 1996; TYTGAT, 1994).

6.5 Serien - Spots

Problematisch war die Antigenauswertung einiger Proteine in den Serien-Spots. Beispielsweise weist die Isositrat-Dehydrogenase mit den Spots 487, 489, 812 und 820 eine nur geringfügig unterschiedliche Signifikanz bezüglich der Frequenz der Antigenerkennung und des arithmetischen Mittelwerts der Intensität auf. Die Spots 487 und 489 hatten bei der Karzinomgruppe gleiche Frequenzen. Diese Spots sind auch bei den Ulkus- und Gastritisgruppen als annähernd gleich intensiv erkannt worden. Die Verteilung der Spots 820 und 821 dieses Antigens in den einzelnen Gruppen zeigte ebenfalls geringe Unterschiede. Die unterschiedliche Verteilung von Hauptspots für das Enzym Isocitrat-Dehydrogenase kann auf Unterschiede der Sequenzen von Proteinen zwischen *Helicobacter pylori* und anderen kreuzreaktiven Bakterien oder Wirtsproteinen hindeuten. In einer anderen Studie (McATEE et al., 1998) wurden zwei Proteinspots dieses Antigens mit unterschiedlicher Proteinsequenz erkannt.

6.6 Analyse der Serumpools

Die große Anzahl der Proteinspots und deren Intensitäten bei den Serumpools hängt wahrscheinlich mit der Resistenz des *Helicobacter pylori* zusammen. Hier spielen vermutlich auch unterschiedliche Aspekte der Eradikationstherapie (französische - oder italienische - Trippeltherapien etc.) eine Rolle.

Die große Anzahl der Proteinspots und deren Intensitäten bei den *Helicobacter*-positiven Pools kann auf die Kreuzreaktivität anderer Keime zurückgeführt werden, ebenfalls wie die Tatsache, dass bei den Pools noch nicht bekannte Proteinspots aufgetreten sind.

Einige Autoren suchen unter erkannten *Helicobacter*-Proteinen mit definierten Serumpool-Analysen nach möglichen Vakzinekandidaten (McATEE et al., 1998).

Um mögliche Unterscheidungsmerkmale zwischen den definierten Serumpools zu analysieren, sollten möglichst viele Pools mit Seren verschiedener Folgeerkrankungen der *H. pylori*-Infektion untersucht werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Nachweismöglichkeiten von *Helicobacter pylori* und deren Vergleich. Hierfür ist eine genaue Kenntnis der *Helicobacter*-Proteine notwendig. Zu diesem Zweck wurde die humorale Immunantwort gegenüber *Helicobacter pylori* unter Anwendung der Methodik des zweidimensionalen Immunoblots analysiert. Zunächst wurden Proteine des autologen *Helicobacter pylori*-Stammes über zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen geblottet und sodann mit Antikörpern aus autologem Plasma sowie Antikörpern aus dem Überstand von in vitro kultiviertem autologem Biopsiematerial detektiert.

Zur Bestimmung einer *Helicobacter*-Infektion wurden andere invasive und nicht invasive Tests genutzt. In einer prospektiven Untersuchung wurden über 200 konsekutive Patienten mit gastrointestinalen Beschwerden und unbekanntem *H. pylori*-Status, die für eine Gastroskopie vorgesehen waren, routinemäßig untersucht. Bei jeder Gastroskopie wurden zwei Antrum- und zwei Korpusbiopsien zur Gastritis-Diagnostik und zur Bestimmung des *H. pylori*-Status entnommen.

Es wurden Assoziationen zwischen einer Infektion mit *Helicobacter pylori* und Erkrankungen wie akute und chronische Gastritis, gastraler und duodenaler Ulkus, Magenkarzinom und Folgeerkrankungen der Gastritis überprüft.

Dabei wurden auch die eindeutig *Helicobacter pylori*-negativen Seren mit den positiven Seren verglichen.

Trotz ungleichmäßiger Verteilung der Patientenzahlen über die einzelnen Krankheitsgruppen (Gastritis, Ulkus, Karzinom) wurden bestimmte Proteine nur bei

einer der Erkrankungen erkannt. Einige Proteinspots kamen deutlich intensiver bei einer einzigen Krankheitsgruppe vor.

Anzustreben sind Studien mit größeren Patientenzahlen innerhalb der einzelnen Krankheitsgruppen, um mögliche weitere Assoziationen bestimmter *Helicobacter*-Antigene mit Folgeerkrankungen zu analysieren und zu verifizieren.

Ferner wurde das Vorliegen einer Assoziation des zweidimensionalen Immunoblots mit anderen invasiven und nicht invasiven Nachweisverfahren der *H. pylori*-Infektion analysiert. Dabei wurde das Antigenprofil des *H. pylori*, sowohl qualitativ als auch quantitativ, berücksichtigt.

Durch die Charakterisierung und Identifizierung einer bedeutenden Anzahl von *Helicobacter*-Proteinen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für ein zukünftig beschleunigtes Screening in Richtung protektiver Vakzine-Kandidaten.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A.K, Lichtman A. H., Pober J.S. (1996): Immunologie, Verlag Hans Huber, Bern. Göttingen.Toronto. Seattle, 2: 80-83 und 77-85.
- Adams, P., Fowler, R., Howell, G., Kinsella, N., Skipp, P., Coote, P., O'Connor, C.D. (1999): Defining protease specificity with proteomics: a protease with a dibasic amino acid recognition motif is regulated by a two-component signal transduction system in Salmonella. *Electrophoresis* 20: 2241-2247.
- Anderson, N.L., Tracyrp, Anderson, N.G. (1984): High - resolution two - dimensional electrophoretic mapping of plasma proteins. In: The Plasma Proteins. Vol. IV.Plutnam FW, Hrsg. New York: Academie Press; 221-70.
- Anderson, N.G. und Anderson, N.L. (1996): Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* 17(3), 443-53.
- Asaka, M., Kimura, T., Kato, M., Kudo, M., Miki, K., Ogoshi, K., Kato, T., Tatsuta, M., Graham, D.Y.,. Possible role of *H. pylori* infection in early gastric cancer development. *Cancer*. (1994); 73: 2691-2694.
- Azuma,T., Kato,T., Hirai, M., Ito,S., Kohli,Y. (1996): Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J.* 11: 662-669.
- Banerjee, S., Hawksby, C., Miller, S., Dahill, S., Beattie, A.D., McColl, K.E.L. (1994): Effect of *Helicobacter pylori* and its eradication on gastric juice ascorbic acid. *Gut*; 35: 317.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H., Rotilio, G. (1987): Aspects of the structure, function and application of superoxidase dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22: 111-180.
- Bazzoli, F., Zagari, R.M., Fossi, S., Pozzato, P., Alampi, G., Simoni, P., Sottili, S., Roda, A., Roda, E. (1994): Short-term low-dose triple therapy for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*1994; 6: 773-777.
- Berkowicz, J., Lee, A. (1987): *Lancet* 1987 / II: 680-681.

- Bizzozero, G.: Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehung ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch. Mikr. Anat.* 42, 82-152 (1893).
- Blaser, M.J. (1990): *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *Journal of Infectious Diseases*. 161: 626-633 .
- Blaser, M.J. und Parsonnet, J. (1994): Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *Journal of Clinical Investigation*. 94: 4-8.
- Blaser, M.J. (1997): Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Journal of Clinical Investigation*. 100: 759-762.
- Blaser, M.J. (1992): Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *H. pylori*-induced inflammation. *Gastroenterol.* 102: 720-727.
- Blaser, M.J. (1993): *Helicobacter pylori*: microbiology of a "slow" bacterial infection. *Trends in Microbiology* 1: 255-260.
- Blaser, M.J., Smith, P.F., Repine, J.E., Joiner, K.A. (1988): Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. *J. Clin. Invest.* 81: 1434-1444.
- Blecker, U., Lanciers, S., Hauser, B., Mehta, D.J., Vandenplas, Y. (1995): Serology as a valid screening test for *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic subjects. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 119 (1): 30-32.
- Blum, A.L., Bayerdörffer, E., Börsch, G., Classen, M., Creutzfeldt, W., Hotz, J., Koob, J., Labenz, J., Malfertheiner, P., Rösch, W., Schepp, W., Stolte, M., Stremmel, W., Suerbaum, S. (1997): The *Helicobacter* revolution. *Leber-Magen-Darm*. 3: 170-177.
- Blum, A.L., Kreiss, C., Armstrong, D. (1995): Funktionelle Dyspepsie: Ansätze für eine *Helicobacter pylori*-Eradikationstherapie. *Leber-Magen-Darm* 25 (3/95): 112-113.
- Bock, H., Mares, A. (1997): Aktueller Stand der *Helicobacter pylori* - Eradikationstherapie. *Fortschritte der Medizin* 115 Jg.-Originalien Nr.II-III/1997, S.31-35.
- Bohmeyer, J., Heller, A., Hartig, C. et al. (1996): Assoziation der chronischen Urtikaria mit *Helicobacter- pylori*-induzierter Antrum - Gastritis. *Hautarzt* 1996; 47: 106-108.
- Börsch, G. (1988): *Leber - Magen - Darm* 18, 9-16.

- Börsch, G., Mai, U., Rühl, G.H. (1989): Fortschritte der Medizin (Autorisierter Sonder-Druck); 1989 Urban und Vogel, München: 8.
- Boettcher, A. (1874): Zur Genese des perforierenden Magengeschwürs. *Dorbater Medizinische Zeitschrift*, 5: 148.
- Caspry, W.F. und Rösch, W. (1997): Diagnosis and treatment of helicobacter pylori infection-reply. *Leber-Magen-Darm* 27: 179-180.
- Caspary, W.F.(1996): Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) in Frankfurt vom Oktober 1995 bis April 1996 und Zeitschrift für Gastroenterologie 34: 392-401.
- Cho, C., Murthy, U.K., Linscheer, G., Pèrez-Pèrez, G.I., Blaser, M.J. (1994): Is intestinal metaplasia a consequence of *H. pylori* gastritis? *Gastroenterology* 106 (4): A 62.
- Christie, J.M., McNulty C.A., Shepherd, N.A., Valori, R.M. (1996): Is saliva serology useful for the diagnosis of *Helicobacter pylori* ? *GUT* 39: 27-30.
- Clarkson, K.S., West, K.P. (1993): Gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. *J. clin. Pathol.* 46: 997-999.
- Clayton, C.L., Pallen, M.J., Kleanthous, H., Wren, W., Tabaqchali, S. (1990): Nucleotide sequence of two Genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. *Nucl. Acids res.* 18: 362.
- O'Connor, C.D., Farris, M., Fowler, R., Qi, S.Y. (1997): The proteome of Salmonella enterica serovar typhimurium: current progress on its determination and some applications. *Electrophoresis* 18:1483-1490.
- Correa, P., Ruiz, B. (1989): *Campylobacter pylori* and gastric cancer. In: Rathbone B.J., Heatley R.V., editors. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. Oxford: Blackwell; 139.
- Covacci, A., S.Censini, M.Bugnoli, R.Petracca, D.Burroni, G.Macchia, A.Massone, E. Papini, Z.Xiang, N.Figura et al. (1993): Molecular characterization of the 128-KDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5791-5795.
- Cover, L.T., Dooley, C.P., Blaser, M.J. (1990): Charakterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatans with vacuolating cytotoxin activity. *Infect. Immun.* 58: 603-610 .

- Crabtree, J.E., Peichl, P., Wyatt, J.I., Lindly, I.J.D. (1992): Gastric interleukin-8, and Anti-interleukin-8 IgA antibodies in *Helicobacter pylori* infection. *Ir. J. Med. Sci.* 161: 20.
- Cutler, A.F., Prasad, V.M. (1996): Long-term follow-up of *Helicobacter pylori* serology after succesful eradication. *Am. J. Gastroenterol.* 91 (1): 85-88.
- Denizot, Y., Sobhani, I., Rambaud, J-C., Lewin, M., Thomas, J., Benveniste, J. (1990): Paf-acether Synthesis by helicobacter pylori. *Gut*, 31: 1242-1245.
- Dixon, M. (1993): Acid, ulcers, and *H. pylori*. *Lancet* 342: 384-85.
- Dooley, C.P., Fitzgibbons, P., Cohen, H., Appleman, M.D., Perez-Perez, G., blaser, M.J. (1988): Prevalence and distribution of Campylobacter pylori in an asymptomatic population (abstract). *Gastroenterology* 94, A 102.
- Dunn, B.E., Campell G.P., Perez-Perez, G.I., Blaser M.J. (1990): Purification and charakterization of Urease from *H. pylori*. *J.Biol.Chem.* 265: 29-34.
- Dunn, B.E., Roop II, R.M., Sung, C.C., Sharma, S.A., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J. (1992): Identification and purification of a cpn60, heat shock protein homolog from *H. pylori*. *Infect.Immun.* 60: 1946-1951.
- Dye, K.R., Marshall, B.J., Frierson Jr., H.F., Pambianco, D.J., McCallum, R.W. (1990): *Campylobacter pylori* colonizing heterotopie gastric tissue in the rectum. *Am. J.Clin.Pathol.* 93: 144-147.
- Eck, M., Schmaußer, B., Haas, R., Greiner, A., Czub, S., Müller-Hermelink, H.K. (1997): MALT-type lymphoma of the stomach is associated with *Helicobacter pylori* strains expressing the Cag A protein. *Gastroenterology*; 112 . 1482-1486.
- Eckerskorn, C., Mewes, W., Goretzki, H., Lottspeich, F. (1988): *Eur. J. Biochem.* 176: 509-519.
- Eldrige, J., Lessels, H.M., Jones, D.M. (1984): Antibody to spiral organisms on gastric mucosa. *Lancet* 1, 1237.
- Evans, D.J. Jr., Evans, D.G., Graham, D.Y. (1993): Identification of an iron-containing superoxidase dismutase in *Helicobacter pylori*. *Acta Gastro-Enterologica Belgica* 56 (Suppl.): 110.
- Faulde, M., Schroder, J.P., Sobe, D. (1992): Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection by detection of immunoglobulin G antibodies using an immunoblot technique and enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect* 11: 589-594.
- Faulde, M., Cremer, J., Zoller, L. (1993): humoral immuno response against *Helicobacter pylori* as determined by immunoblot. *Electrophoresis* 14: 945-951.

- Fiocca, R., Luinetti, O., Villani, L., Chiaravalli, A., Cornaggia, M., Stella, G., Perego, M., Trespi, E., Solcia, E. (1993): High incidence of *H. pylori* colonization in early gastric cancer and the possible relationship to carcinogenesis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 5: 2-8.
- Fischbach, W. (1999): Gastrointestinale Lymphome. *Deutsches Ärzteblatt* 96, Heft 16: 37-40.
- Forman, D., Newell D.G., Fullerton F., Yarnell YWG, Stacey A.R, Wald N., Sitas F. (1991): Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation; 1302-1305.
- Forman, D. (1992): *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinogenesis. *Eur. J. Gastroenterol.* 4 (2): 31-35.
- Forman, D., Webb P. (1993): Geographic distribution and association with cancer. In: Northfield TC, Mendall M, Coggin PM, eds. *Helicobacter pylori Infection*. London: Kluwer Academic; 11-20.
- Freedberg, A.S. and Barron, L.E. (1940): The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Am. J. Dig. Dis.* 7: 443-445.
- Fukuda, H., Saito, D., Hayashi, S. (1995): *Helicobacter pylori* infection, serum pepsinogen level and gastric cancer: a case-control study in Japan. *Jpn. J. Cancer Res.* 86: 64-71.
- Geesey, G.G. (1982): Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *ASM News* 48: 9-14.
- Glick, G.R., Pasternak, J.J. (1994): *Molekulare Biotechnologie*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg. Berlin. Oxford; 202.
- Goodwin, C.S., Worsley, B.W. (1993): Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol. Clin. North Am.*; 22 (1): 5-19.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A. (1990): Microbiological aspects of *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 1-3.
- Goodwin, C.S. (1988): Duodenal ulcer, *Campylobacter pylori* and the "leaking roof" Concept. *Lancet*; ii. 1467.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Marshall, B.J. (1986): *Campylobacter pyloridis*, gastritis and peptic ulceration. *J. Clin. Pathol.* 39, 353-365.
- Gormally, S.M., Kierce, B.M., daly, L.E. (1996): Gastric metaplasia and duodenal ulcer disease in children infected by *Helicobacter pylori*. *Gut* 38: 513-17.

- Graham, D.Y., Malaty, H.M., Evans, D.G., Evans, D.J.J., Klein, P.D., Adam, E. (1991a): Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology* 100: 1495 - 1501.
- Graham, D.Y., Adam, E., Reddy, G.T., Agarwal, J.P., Agarwal, R., Evans, D.J., Malaty, H.M., Evans, D.G. (1991b): Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries. *Dig. Dis. Sci.* 36: 1084-1088.
- Hazell, S.L., Evans, D.J., Graham, D.J. (1991): *Helicobacter pylori* catalase . *J. Gen. Microbiol.* 137: 57.
- Heilmann, K.L., Stolte, M., Borchard, F., Heine, M., Löning, Th., Ottenjann, R., Remmele, W., Rühl, G., Schaefer, H.E., Schlake, W., Seib, H.J., Stamm, B., Steininger, H., Wiebecke, B. (1989): Gastritis - Graduierung und Klassifikation. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 73, 569-570.
- Heukeshoven, J., Dernick, R. (1985): Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamid gels and the mechanism of silver staining. *Elektrophoresis* 6, 103-112.
- House, C., Wettenhall, R.E., Kemp, B.E. (1987): The influence of basic residues on the substrate specificity of protein kinase. *C. Journal Of Biological Chemistry.* 262 (2), 772-7.
- Huang, J.Q., Sridhar, S., Chen, Y. (1998): Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastroenterology* 114: 1169-79..
- Johansen, H.K., Norgaard, A., Andersen, L.P., Jensen, P., Nielsen, H., Hoiby, N. (1995): Cross-reactive antigens shared by *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *campylobacter jejuni*, and *Haemophilus influenza* may cause false-positive titers of antibody to *H. pylori*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2: 149-155.
- Jones, D.M., Eldridge, J., Whorwell, P.J. (1987): *Brit. med. J.* 294: 615.
- Jungblut, P.R., Stöffler, G. (1997): Praktikum. Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen. Institut für mikrobiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Innsbruck. 14-15.
- Jungblut, P.R., Bumann, D., Haas G., Zimny-Arndt, U., Holland P., Lamer S., Siejak F., Aebischer A., Meyer T.F. (2000): Comparative proteome analysis of *helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 36: 710-25.

- Jungblut, P.R., Grabher, G., Stöffler, G. (1999): Comprehensive detection of immuno-relevant *Borrelia garinii* antigens by two - dimensional elektrophoresis. *Elektrophoresis* 20: 3611-3622.
- Kahn, P. (1995): From genome to proteome: looking at a cell's proteins (news). *Science*. 270 (5235). 369-70.
- Kikuchi, S., Wada, O., Nakajima, T. (1995): Serum anti - *Helicobacter pylori* - antibody and gastric carcinoma among young adults. *Cancer*. 75; 2789-93.
- Kimmel, B., Bosserhoff, A., Frank, R., Groß, R., Goebel, W., Beier, D. (2000): Identification of Immunodominant Antigens from *Helicobacter pylori* and Evaluation of Their Reactivities with Sera from Patients with Different Gastroduodenal Pathologies. *Infection and Immunity*, Feb.2000, p. 000-000; 138.
- Kist, M. (1988): Zur Epidemiologie, Prävalenz, Histopathologie und klinischen Symptomatik der *Campylobacter pylori* - Besiedlung. In: Ottenjann, R., Schmitt, W. (eds.): Aktuelle Gastroenterologie - *Campylobacter pylori*. Springer Verlag, Berlin (1988), 66-74.
- Klaamas, K., Held, M., Wadstrom, T., Lipping, A., Kurtenkov, O. (1996): IgG immune response to *Helicobacter pylori* antigens in patients with gastric cancer as defined by ELISA and immunoblotting. *Int J Cancer* 67: 1-5.
- Klose, J. (1995): Protein mapping by compined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in maamals. *Humangenetik*. 26, 123-243.
- Kolts, B.E., Joseph, B., Achem, S.R., Bianchi, T., Monteiro, C. (1993): *Helicobacter pylori*. Detection A Quality and Analysis. *Am. J. Gastroenterol.*, 88: 650-55.
- Kolibasova, K., Cervencova, D., Hegyi, E., Lengyelova, J., Toth, J. (1994): *Helicobacter pylori* - Ein möglicher ätiologischer Faktor der chronischen Urtikaria. *Dermatosen* 1994; 42: 235-236.
- Krajden, S., Fuksa, M., Anderson, J., Kempston, J., Boccia, A., Petrea, C., Babida, C., Karmali, M., Penner, J.L. (1989): Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1397-1398.
- Kramer, M.D. (1997): Immunologie und Immunpathologie, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart; 142-151.

- Krienitz, W.(1906): Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Formen im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. Dtsch.Med.Wochenschr. 28:872.
- Labenz, J. und Börssch, G. (1996): Aktuelle Therapie der *Helicobacter-pylori*-Infektion in: *Helicobacter pylori* - Von der Grundlage zur Therapie: Malfertheiner, P. (1996). Georg-Thieme-Verlag. Stuttgart.New York. (2.Auflage) 149-160.
- Lee, A., Hazell, S.L. (1988): *Campylobacter pylori* in health and disease: an ecological perspective. Microb. Ecol. Health Dis. 1: 1-16.
- Lehn, N., Megraud, F. (1996): Diagnosis of *Helicobacter pylori*. Curr. Opin. Gastroent. 12, 6-10.
- Lehninger, E.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1994): Prinzipien der Biochemie (2.Auflage), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Berlin. Oxford: 151-160.
- Levi, S., Beardshall, K., Haddad, G., Playford, R., Ghosh, P., Calam, J. (1989): *Campylobacter pylori* and duodenal ulcers: the gastrin link. Lancet; i: 1167.
- Lindkvist, P., Asrat, D., Nilsson,I., Tsega, E., Olsson, G.L., Wretling, B. und Giesecke, J. (1996): Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection - coparison of a high and a low prevalence country. *Scandinaivan Journal of Infectiosus Diseases*. 28: 181-184.
- Lior, H., Johnson, W.H. (1985): Catalase, peroxide dismutase activities in *Campylobacter* spp. In: Pearson, A.D., Skirrow, M.B., Lior, H. and Rowe, B.(Eds.): *Campylobacter* III: Proceedings of the Third International Workshop on *Campylobacter* Infections. Public Health Laboratory Service, London, pp. 226-227.
- Lodisch, H., Baltimore, D., Berk, A., Zibursky, S.L., Matsudaira, P., Darroll, J. (1996): Molekulare Zellbiologie, 2. Auflage, de Gruyter; Berlin. New York; 94-102.
- Lohaus, C., Meyer, H.E. (1998): Proteomforschung in: Biospektrum. 5.98: 32-33.
- McAtee, C.P., Lim, M.Y., Fung, K., Velligan, M., Fry, K., Chow, T., Berg, D.E. (1998): Identification of Potential Diagnostic and Vaccine Candidates of *Helicobacter pylori* by Two-Dimensional Gel Elektrophoresis, Sequence Analysis, and Serum Profiling. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, July 1998, p.537-542; 99.
- McNulty, C.A.M. (1989): Detection of *Helicobacter. Pylori* by the biopsy urease test. In: Rathbone, B.J.,Heatly, R.V. (Hrsg.): *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. Oxford: Blackwell Scientific Publications: 69-73.

- Malfertheiner, P.: Nicht-ulzeröse Dyspepsie - chronische Gastritis in: Malfertheiner, P. (Hrsg.): *Campylobacter pylori* - neuer Aspekt bei chronischer Gastritis und peptischem Ulkus. Unas Verlag. Aachen. 35-40.
- Malfertheiner, P. (1996): *Helicobacter pylori* - Von der Grundlage zur Therapie. 2. Auflage. G. Thieme Verlag . Stuttgart. New York . 17.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bell, D., Bianchi, P.G., Deltentre, M., Forman, D., Gasbarrini, G., Jaup, B., Misiewicz, J.J., Pajares, J., Quina, M., Rauws, E. (1997): Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht Consensus Report. The European *Helicobacter Pylori* Study Group (EHPSG). *European Journal of gastroenterology and Hepatology*. 9: 1-2.
- Marshall, B.J. and Warren, J.R. (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patient with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet* 16: 1311-1314.
- Marshall, B., Armstrong, J., McGeachie, D., Glancy, R. (1985): Attempt to fulfil Koch's postulate for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* 152: 436-439.
- Marshall, B.J. (1986): *Campylobacter pyloridis* and gastritis. *J. Infect. Dis.* 153, 650-657.
- Megraud, F. (1996): Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 31: 57-62.
- Mitchell, H.M., Li, Y.Y., Hu, P.J., Liu, Q., Chen, M., Du, G.G., Wang, Z.J., Lee, A., Hazell, S.L. (1992a): Epidemiology of *Helicobacter pylori* in Southern China - Identification of early childhood as the critical period for acquisition. *J. Infect. Dis.* 166: 149-153.
- Mitchell, H.M., Li, J., Hu, P., Hazell, S.L., Du, G., Byrne, D.J., Lee, A. (1992b): The susceptibility of *Helicobacter pylori* to bile may be an obstacle to faecal transmission. *Eur. J. Gastro. Hepatol.* 4 (Suppl. 1): 79-83.
- Mitchell, H.M. et al.: *Lancet* (1987 / II): 681-682.
- Moayyedi, P., Feltbower, R., Brown, J., Mason, S., Mason, J., Nathan, J., Richards, G., Dowell, A.C., Axon, A.T.R. (2000): Effect of population screening and treatment for *Helicobacter pylori* on dyspepsia and quality of life in the community: a randomised controlled trial. *THE LANCET*. Vol 355. May 13, 2000: 1665-1667.
- Morgner, A., Bayerdörffer, E., Malfertheiner, P. (1997): Therapeutischer Übersichtsplan *Helicobacter pylori*. *Medizin im Bild* 5/1997: 48-49.

- Morris, G.P., Bass B.K., Holitzner C.A., Williamson, T. E. (1993): Mucosal secretion and cytoprotection of the rat gastric mucosa. *J. Clin. Gastroenterol.* 17 (Suppl.1): S.5 - S.10.
- Newell, D.G., Stacey, A. (1989): Antigens for the serodiagnosis of *Campylobacter pylori* infections. *Gastroenterol. Clinique. Biolog.*, 13: 219 - 223.
- Nilsson, I., Ljungh, A., Aleljung, P., Wadstrom, T. (1997): Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. *J Clin Microbiol* 35: 427-432.
- Nishizono, A., Gotoh, T., Fujioka, T., Murakami, K., Kubota, T., Nasu, M., Watanabe, M., Mifune, K. (1998): Serological assessment of the early response to eradication therapy using an immunodominant outer membrane protein of *Helicobacter pylori*. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 856-861.
- Nomura, A., Stemmermann, G.N., Chyou, P.H. et al. (1991): *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N. Engl. J. Med.* 325, 1132-1136.
- Norgaard A., Nielsen, H., Andersen, L.P. (1993). Activation of human phagocytes by *Helicobacter pylori* - a novel interaction with neutrophils and monocytes distinct from that of N - formylated oligopeptides. *Zbl. Bakt.- Int. J. Med. Microbiol.* 280-86.
- O'Brien, B., Goeree, R., Mohamed, A.H., Hunt, R. (1995): Cost-effectiveness of *Helicobacter* eradication for the long-term management of duodenal ulcer in Canada. *Archives of Internal Medicine.* 155: 1958-1964.
- O'Connor, C.D., Farris, M., Fowler R., Qi, S.Y. (1997): The proteome of *Salmonella enterica* serovar typhimurium: current progress on its determination and some applications. *Electrophoresis.* 19: 1483-90.
- Parsonnet, J., Friedman G.D., Vandersteen D., Chang, Y., Vogelmann, J.H., Orentreich, N., Sibley, R.K.: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* (1991): 325: 1127-1131.
- Parsonnet, J. (1993): *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastroenterol. Clin. N. America*; 22, 1: 89.
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, V., Vogelmann, J.H., Friedman, G.D. (1994): *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N. Engl. J. Med.* (1994); 330: 1267-1270.

- Perez-Perez, G.I., Taylor, D.N., Bodhidatta, L., Wongsrichanalai, J., Baze, W.B., Dunn, B.E., Echeverria, P.D., Blaser, M.J. (1990): Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Thailand. *J. Infect. Dis.* 161: 1237-1241.
- Perez-Perez, G.I., Dworkin, B., Chodos, J., Blaser, M.J. (1988): *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann. Intern. Med.* 109: 11-17.
- Peura, D. (1998): *Helicobacter pylori*: rational management options. *American Journal of Medicine.* 105: 424-430.
- Pounder, R.E., Ng, D. (1995): The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different Countries. *Aliment Pharmacol. Ther.* 9 (Suppl. 2): 33-39.
- Price, A.B. (1991): The Sydney System: Histological division. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*; 6: 209-22.
- Price, A.B., Misiewicz, J.J. (1992): Grading in classification of chronic gastritis: the response of the working party. *Gastroenterology* 103.1116.
- Raedsch, R., Pohl, S., Plachky, J., Stiehl, A., Kommerell, B. (1989): The growth of *Campylobacter pylori* is inhibited by intragastric bile acids. In: Megraud, F., Lamouliatte, H. (eds.). *Gastroduodenal pathology and campylobacter pylori*. Elsevier. Amsterdam, pp. 409-412.
- Rathbone, B.J., Wyatt, J.I., Heatly, R.V. (1986): *Campylobacter pyloridis*-a new factor in peptic ulcer disease ? *Gut.* 27: 635-641.
- Rathbone, B.J., Wyatt, J.I., Worsley, B.W., Shires, S.E., Trejdosiewicz, L.K., Heatley, R.V., Losowsky, M.S. (1987): Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridis* in non - ulcer dyspepsia. *Gut.* 642-647.
- Rebora, A., Drago, F., Picciotto, A. (1994): *Helicobacter pylori* in patients with rosacea. *Am. J. Gastroenterol.* 89: 1603-1604.
- Risch, G. (1998): Antikörpertypisierung. Institut Dr. Risch; Laboratorien *FAMH* (1998).
- Roitt, I.V., Brostoff, J., Male, D.K. (1995): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, 3. Auflage, Thieme, Stuttgart. New York: 87-106.
- Safe, A.F., Warren, B., Corfield, A., McNulty, C.A., Watson, B., Mountford, R.A., Read, A. (1993): role of serology in monitoring treatment for *Helicobacter pylori* infection in elderly patients. *Age ageing* 22 (4): 256-259.
- Sarosiek, J., Peura, D. E., Guerrant, R.L., Marshall, B.J. (1991): Mucolytic effects of *H. pylori*. *Scand. J. gastroenterol.*, 26 Suppl. 187: 47-55.

- Schmitt, W., Haas, R. (1994): Genetic analysis of the *H. pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported. Mol. Microbiol. 12: 307-319.
- Seifert, E. (1996): *Helicobacter pylori* und Magenkarzinom. In: *Helicobacter pylori* - Von der Grundlage zur Therapie. Malfertheiner, P. (Herausgeber). 2. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York: 109-120.
- Sipponen, P., Varis, K., Fraki, O., Korri, U.M., Sepälä, K., Siurala, M. (1990): Cumulative 10 - year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with and without gastritis. A clinical follow - up of 454 patients. Scand. J. Gastroenterol. 25-960.
- Sitas, F., Forman, D., Yarnell, J.W., Burr, M.L., Elwood, P.C., Pedley, S., Marks, K.J. (1991): *Helicobacter pylori* infection rates in relation to age and social class in a population of Welsh men. Gut 32: 25-28.
- Slomiani, B.L., Nishikawa, H., Piotrowski, J., Okazaki, K., Slomiani, A. (1989): Lipolytic activity of *Campylobacter pylori*: effect of sofalcone. Gastroenterology. 94-399.
- Sobala, G.M., Schorah, C.J., Shires, S., Lynch, D.A.F., Gallacher, B., Dixon, M.F., et al. (1993): Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on gastric juice asorbic acid concen - Trations. Gut; 34: 1038.
- Stadelmann, O. (1996): *Helicobacter pylori* und funktionelle Dyspepsie in: *Helicobacter pylori* - Von der Grundlage zur Therapie. Malfertheiner, P. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. New York: 75-76.
- Stolte, M. und Heilmann, K. L. (1980): Neue Klassifikation und Graduierung der Gastritis. Leber-Magen-Darm. 19: 220-226.
- Stolte, M., Bethge, B., Ritter, M., Lauer, F., Eidt, H. (1990): Praxis der Gastritis-Klassifikation. Endoskopie Heute 4. 228.230.
- Stolte, M. (1994): Pathologie der *Helicobacter pylori* Krankheiten. In: Malfertheiner, P., editor. *Helicobacter pylori* - Von der Grundlage zur Therapie. Stuttgart. Thieme.19.
- Strickland, R.G., Mackay, I.R. (1973): A reappraisal of the natur and significance of chronic atrophic gastritis. Am. J. Dis. 18: 426-440.
- Suerbaum, S. (1996): Bakterielle Physiologie und Virulenzfaktoren in: *Helicobacter pylori* - Von der Grundlage zur Therapie. Herausgegeben von Peter Malfertheiner. 2. Auflage. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart. New York. S.11-23.

- Tarkkanen, J., Kosunen, T.U., Saksela, E. (1993): Contact of lymphocytes with *Helicobacter pylori* augments natural killer cell activity and induces production of gamma interferon. *Infect. Immun.* 61-3012.
- Tebbe, B., Schulzke, J.-D., Radenhausen, M., Orfanos, C.E. (1999): Bedeutung von *Helicobacter pylori* bei Dermatosen. In: *Deutsches Ärzteblatt* 1999; 96. Heft 34-35: A-2143-2148.
- Toerner, H.J., Wolf, G. (1997): *Fortschritte der Medizin* 115. Jg.-Originalien Nr.II-III.15-18.
- Tonella, L., Walsh, B.J., Sanchez, J.C., Ou, K., Wilkins, M.R., Tyler, M., Frutiger, S., Gooley, A.A., Pescaru, I., Appel, R.D., Yan, J.X., Bairoch, A., Hoogland, C., Morch, F.S., Hughes, G.J., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F. (1998): '98 *Escherichia coli* SWISS-2DPAGE database update. *Elektrophoresis*. 19: 1960-71.
- Twedt, D.C., Tams, T.R. (1989): Diseases of the stomach. In Sherding RG (ed): *The cat: Diseases and clinical management*; Vol.2; Churchill Livingstone New York: 929-54.
- Twedt, D.C., Magne, M.L. (1986): Chronic gastritis. In: Kirk RW (ed): *Current Veterinary therapy* 9. WB Saunders Philadelphia: 852-868.
- Tytgat, G.N. (1994): Long - term consequences of *Helicobacter pylori* eradication. *Scand J. Gastroenterol.* 29 (suppl.): 38-44.
- Van Bohemen, C. G., Langenberg, W. L., Rauws, E. A. J., Oudbier, J., Weterings, E. und Zanen, H. C. (1989): Rapidly decreased serum IgG to *C. pylori* following elimination of *Campylobacter* in histological chronic biopsy *Campylobacter* positive gastritis. *Immunol. Letters*. 20: 59-62.
- Wallace, N., Beck, P.I., Moris G.P. Is there a role for leukotriens as mediators of ethanol-induced gastric mucosal damage ? *Am. J. Physiol.* 254-G117.
- Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S., Nakao, M. (1998): *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterol.*; 114: 642-648.
- Whitaker, C.J., Dubiel, A.J., Galpin, O.P. (1993): Social and geographical risk factors in *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol.Infect.* 111: 63-70.
- Widmer, M., de Korwin, J.D., Aucher, P., Thiberge, J.M., Suerbaum, S., Labigne, A., Fauchere, J.L. (1999): Performance of native and recombinant antigens for

- diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 823-826.
- Wotherspoon, A.C., C. Doglioni et al. (1993): Regression of primary low-grade B-cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342, 575-7.
- Yazawa, N., Fujimoto, M., Kikuchi, K., Kubo, M., Ihn, H., Sato, S., Tamaki, K. (1998): High seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with systemic sclerosis: Association with esophageal involvement. *J. Rheumatol.*; 25: 650-653.
- Zevering, Y., Jacob, L., Meyer, T.F. (1999): naturally acquired human immune responses against *Helicobacter pylori* and implications for vaccine development. *Gut* 45 . 465-474.

9 ANHANG

Tab. 16: Gesamtübersicht über die Patientendaten

(früh. Hp: vor der Studie *H. pylori* diagnostiziert, spec: Spezial, era: eradiziert, Histo.: Histologie, Kultur: *H. pylori*-Anzucht, Patient: hier statt Namen nur Kürzel) (IgG, IgA: *H. pylori* spezielle ELISA-Werte)

| Blot | Patient | Pool | früh. Hp | spec IgG (E-ml) | spec IgA (E-ml) | CLO | era | Histo | Kultur |
|------|----------|------|----------|-----------------|-----------------|-------|-----|-------|--------|
| 2 | 8 Ka | - | ? | 570 | hoch (+) | - | - | + | + |
| 4 | 44 MPI | 7 | + | - | - | + | - | - | - |
| 6 | 46 MPI | - | - | - | - | + | - | + | + |
| 7 | 47 MPI | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 8 | 41 MPI | 0 | - | 34 | 32 | + | - | - | + |
| 8 | 54 MPI | 0 | ? | - | - | + | - | + | + |
| 9 | 8 MPI | 1 | - | - | - | - | - | - | fehlt |
| 9 | 9 MPI | 1 | - | - | - | fehlt | - | fehlt | fehlt |
| 9 | 13 MPI | 1 | - | - | - | fehlt | - | fehlt | fehlt |
| 9 | 24 MPI | 1 | - | - | - | - | - | - | fehlt |
| 10 | 29 MPI | 2 | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | 33 MPI | 2 | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | 38 MPI | 2 | - | - | - | - | - | fehlt | - |
| 10 | 43 MPI | 2 | - | - | - | - | - | fehlt | - |
| 10 | 45 MPI | 2 | - | - | - | - | - | fehlt | - |
| 11 | 6 Ka-UH | 3 | ? | 150 | hoch (+) | - | - | - | + |
| 11 | 10 Ka-A | 3 | ? | 610 | + | + | - | - | + |
| 11 | 31 Ka | 3 | + | 110 | - | + | - | - | + |
| 12 | 24 Ka/UH | 4 | - | 28 | + | + | - | - | - |
| 12 | 88 Ka | 4 | + | 82 | 100 | + | - | + | + |
| 13 | 40 MPI | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | 95 Ka | 6 | - | 250 | 38 | + | - | + | + |
| 15 | 41 MPI | - | - | 34 | 32 | + | - | - | + |
| 16 | 223 Ka | - | + | + | 39 | - | + | + | + |
| 17 | 54 MPI | 0 | ? | - | - | + | - | + | + |
| 18 | 97 Ka | - | + | - | 22 | + | - | + | - |
| 19 | 23 Ka | - | - | 47 | 61 | - | - | + | + |
| 20 | 122 Ka | 7 | + | - | - | + | - | - | - |
| 22 | 6 Ka/UH | 9 | ? | 310 | 74 | + | - | - | + |
| 22 | 42 Ka/UH | 9 | - | 150 | 18 | + | - | - | + |
| 22 | 62 Ka/UH | 9 | - | 390 | 12 | + | - | fehlt | - |
| 22 | 96 Ka | 9 | + | 97 | 110 | + | - | - | - |
| 23 | 107 Ka | 5 | + | 220 | 28 | + | - | + | - |
| 23 | 173 Ka | 5 | - | 170 | 35 | + | - | + | + |
| 23 | 226 Ka | 5 | - | 240 | + | - | - | + | + |
| 25 | 1 MPI | 6 | - | - | - | + | - | + | fehlt |
| 25 | 3 Ka-A | 6 | + | 29 | 150 | + | - | + | + |
| 25 | 95 Ka | 6 | - | 250 | 38 | + | - | + | + |

| | | | | | | | | | |
|-----|-----------|---|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|
| 25 | 17 Ka/ UH | 6 | ? | 12 | 19 | + | - | + | - |
| 25 | 32 MPI | 6 | + | 17 | - | + | - | + | fehlt |
| 25 | 48 MPI | 6 | ? | 11 | - | + | + | + | + |
| 25 | 52 MPI | 6 | + | 13 | - | + | + | + | - |
| 25 | 53 MPI | 6 | + | - | - | - | + | + | - |
| 25 | 59 MPI | 6 | + | 11 | 11 | - | + | - | + |
| 26 | 44 MPI | 7 | + | - | - | + | - | - | - |
| 26 | 122 Ka | 7 | + | - | - | + | - | - | - |
| 26 | 108 Ka | 7 | + | - | - | + | - | + | - |
| 26 | 222 Ka | 7 | + | - | - | - | - | fehlt | - |
| 26 | 224 Ka | 7 | + | - | 28 | - | - | fehlt | - |
| 27 | 20 Ka | 8 | + | 100 | 31 | - | - | - | + |
| 27 | 220 Ka | 8 | + | 280 | - | - | - | fehlt | - |
| 27 | 221 Ka | 8 | + | 260 | - | - | - | fehlt | - |
| 28 | 102 Ka | - | + | 900 | 12 | + | - | + | - |
| 29 | 3 Ka/UH | - | - | 15 | 20 | + | - | - | + |
| 31 | 112 Ka | - | ? | 17 | 170 | + | - | + | + |
| 33 | 61 MPI | - | + | 23 | - | fehlt | - | fehlt | fehlt |
| 34 | 70 MPI | - | + | fehlt | fehlt | + | + | + | + |
| 35 | 71 MPI | - | - | fehlt | fehlt | - | - | - | - |
| 36 | 72 MPI | - | + | fehlt | fehlt | + | + | + | + |
| 37 | 184 Ka | - | ? | + | - | + | - | - | - |
| 38 | 22 Ka | - | - | 24 | - | - | - | + | + |
| 39 | 16 Ka/UH | - | + | 350 | 180 | - | - | + | + |
| 40 | 143 Ka | - | - | 480 | 68 | - | - | - | + |
| 42 | 169 Ka | - | - | 24 | 30 | + | - | + | + |
| 43 | 31 Ka | 3 | + | 110 | - | + | - | - | + |
| 44 | 119 Ka | - | + | 81 | - | + | - | - | - |
| 45 | 80 Ka | - | + | 17 | 50 | + | - | - | - |
| 46 | 213 Ka | - | - | - | 25 | - | - | - | + |
| 47 | 64 Ka | - | ? | 15 | 160 | + | - | - | + |
| 48 | 62 MPI | - | ? | - | 25 | + | - | - | - |
| 49 | 224 Ka | 7 | + | - | 28 | - | - | fehlt | - |
| 102 | 28 MPI | - | - | - | - | - | - | - | fehlt |
| 103 | 31 MPI | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 104 | 42 MPI | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 106 | 29 MPI | 2 | - | - | - | - | - | - | - |
| 107 | 33 MPI | 2 | - | - | - | - | - | - | - |
| 109 | 43 MPI | 2 | - | - | - | - | - | fehlt | - |
| 110 | 45 MPI | 2 | - | - | - | - | - | fehlt | - |
| 111 | 60 MPI | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 112 | 68 MPI | - | - | fehlt | fehlt | - | - | - | - |
| 113 | 69 MPI | - | - | fehlt | fehlt | - | - | fehlt | - |
| 114 | 10 MPI | - | - | - | - | - | - | - | fehlt |
| 116 | 38 MPI | 2 | - | - | - | - | - | fehlt | - |
| 118 | 76 MPI | - | - | fehlt | fehlt | + | - | - | - |
| 119 | 77 MPI | - | - | fehlt | fehlt | fehlt | - | - | fehlt |
| 120 | 80 MPI | - | - | fehlt | fehlt | fehlt | - | - | - |
| 121 | 219 Ka | - | - | 57 | 72 | + | - | - | - |
| 122 | 36 MPI | - | - | fehlt | fehlt | + | - | - | + |
| 123 | 52 MPI | 6 | + | 13 | - | + | + | + | - |
| 124 | 59 MPI | 6 | + | 11 | 11 | - | + | - | + |
| 125 | 20 Ka | 8 | + | 100 | 31 | - | - | - | + |
| 126 | 202 Ka | - | - | - | 17 | + | - | + | + |
| 127 | 226 Ka | - | - | 240 | + | - | - | + | + |
| 128 | 192 Ka | - | - | 230 | 10 | + | - | fehlt | + |
| 129 | 1 MPI | 6 | - | - | - | + | - | + | fehlt |

Tab. 17: Kriterien detektierter Antigene:

1. Spots, die in der Positivgruppe (n=24) überzufällig häufiger aufgetreten sind, als in der Negativgruppe
2. Spots, die in der Positivgruppe (n=24) mit größerer Durchschnittsintensität aufgetreten sind, als in der Negativgruppe
3. Die Verteilung der Seren, die diese Spots erkannt haben, sind in den drei Krankheitsgruppen (G,U,Ca) unterschiedlich
4. Spots, die mit signifikant unterschiedlichen Durchschnittsintensitäten in den drei Krankheitsgruppen (G,U,Ca) erkannt wurden

(G: Gastritis, U: Ulcus, Ca: Karzinom, KGT : Kleingeltechnik, GGT: Großgeltechnik, ORF: Open reading frame)

| KGT | GGT | ORF | Antigen | Kriterien |
|-----|------|---------|--|------------|
| 8 | D226 | HP 0231 | Predicted coding region | 1, 2 |
| 70 | E44 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L7/L12 | 1, 2, 3 |
| 74 | A177 | HP0010 | Hitzeschock-Protein (GroEL) | 3 |
| 78 | D276 | - | nicht identifiziert | 4 |
| 80 | A390 | HP0010 | Hitzeschock-Protein (GroEL) | 2 |
| 87 | E35 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L7/L12 | 2 |
| 90 | A388 | HP0010 | Hitzeschock-Protein (GroEL) | 2 |
| 120 | A29 | HP1293 | DNA-abhängige RNA Polymerase A | 3, 4 |
| 125 | B2 | HP0779 | Aconitat- Hydratase 2 | 3, 4 |
| 135 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 1, 2 |
| 140 | E27 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L7/L12 | 2 |
| 186 | C84 | HP0794 | ATP-abhängige Protease | 3, 4 |
| 187 | A396 | - | nicht identifiziert | 1, 2 |
| 194 | E35 | HP1199 | 50S ribosomales Protein L7/L12 | 1, 2, 4 |
| 207 | A97 | - | Nicht identifiziert | 1, 2 |
| 215 | A192 | HP0010 | Hitzeschock-Protein (GroEL) | 4 |
| 238 | E53 | - | nicht identifiziert | 1, 2 |
| 244 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 1, 2 |
| 251 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 2 |
| 259 | B126 | HP0547 | Cag 26 (Cag A) | 2 |
| 270 | B19 | HP0192 | Fumarat-Reductase (Flavoprotein) | 3 |
| 276 | - | - | nicht identifiziert | 2 |
| 290 | A119 | HP0010 | Hitzeschock-Protein (GroEL) | 2, 3 |
| 293 | B17 | HP0192 | Fumarat-Reductase (Flavoprotein) | 1 |
| 294 | A190 | - | nicht identifiziert | 1, 2 |
| 297 | - | - | nicht identifiziert | 1, 2 |
| 298 | - | - | nicht identifiziert | 2 |
| 327 | A424 | HP0599 | Vorläufer-Protein Hämolyisin-Sekretion | 2 |
| 341 | A107 | HP1307 | 50S ribosomales Protein L5 | 1, 2 |
| 459 | B511 | HP0294 | Aliphatische-Amidase (aimE) | 3, 4 |
| 487 | B499 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 1, 2, 3, 4 |
| 489 | B499 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 1, 2, 3, 4 |
| 499 | D121 | HP0410 | Putative Neuroaminyllactose-Bindung | 4 |
| 501 | - | - | nicht identifiziert | 4 |
| 513 | B492 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 3, 4 |
| 523 | B35 | HP1104 | Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase | 3, 4 |
| 598 | B429 | HP1019 | Serin-Protease | 1, 2 |
| 608 | B437 | HP0875 | Katalase | 2 |
| 668 | - | - | nicht identifiziert | 3, 4 |

| | | | | |
|-----|------|--------|---------------------------------|------|
| 699 | D249 | HP0175 | Hypothetical-Sekretions-Protein | 3, 4 |
| 700 | B320 | HP1152 | Teilchen-Protein Ffh | 3, 4 |
| 704 | B465 | HP1133 | ATP Syntase Gamma Kette | 3, 4 |
| 812 | B499 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 3, 4 |
| 817 | - | - | nicht identifiziert | 3 |
| 820 | B499 | HP0027 | Isocitrat-Dehydrogenase | 3, 4 |

10 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank richtet sich an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. U.-B. **Göbel** für seine großzügige Unterstützung, seine Kritik und Hilfestellung, sowie für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. Thomas F. **Meyer** gilt mein herzlicher Dank für die freundliche Aufnahme und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin.

Frau Dr. Gaby **Haas** danke ich für ihre stets freundliche, engagierte Betreuung während der gesamten Zeit im Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin.

Herrn Prof. Dr. B. **Wiedenmann** und seinem Team in der Endoskopieabteilung des Virchow-Klinikums der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin möchte ich für die gute und effiziente Zusammenarbeit sowie Probenentnahme meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Dr. P. **Jungblut** (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) danke ich für die Einweisung in die Methodik der Zweidimensionalen Gelelektrophorese und die gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. U. **Zimny-Arndt** (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) für die Einarbeitung in die Methode der Zweidimensionalen Gelelektrophorese.

Frau **Wiedersatz** (Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin) danke ich für die Anfertigung der Bakterienanzucht.

Herrn Dr. W. **Metzger** (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) danke ich für seine Ratschläge und Unterstützung.

Herrn Dr. A. B. **Roznowski** (Virchow-Klinikum der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin) danke ich für seine Unterstützung und die Zusammenarbeit.

Bei Herrn K. **Ebermayer** (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) möchte ich mich für seine computer- und labortechnische Hilfeleistung bedanken.

Familie **Askar** danke ich herzlich für ihre computertechnische Hilfe.

Frau Barbara **Kruppa** danke ich für das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Bei meiner Frau **Margarethe** und meinem Sohn **Denis** möchte ich mich ganz herzlich für die moralische Unterstützung und ihr Verständnis im Verlauf dieser Arbeit bedanken.

Schließlich bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen und Mitarbeitern des Max -Planck-Institutes für Infektionsbiologie, Berlin für die freundliche Arbeitsatmosphäre sowie für die Hilfsbereitschaft.

11 LEBENS LAUF

Name : Galip Karaali
Geburtsdatum : 26.03.1957
Geburtsort : Antakya (Antiochia) / Türkei
Wohnung : Zermatter Str. 18
13407 Berlin
Familienstand : verheiratet, 1 Kind

Schulbildung : 1964-1972 Grund- und Mittelschule in Antakya
1972-1976 Gymnasium in Aksehir / Türkei
Ausbildung : 1972-1976 Ausbildung zum Grundschullehrer an der
Pädagogischen Hochschule in Aksehir
1976-1977 Studium der Geschichte in Bursa/Türkei
1981-1991 Medizinstudium an der FU-Berlin
Praktisches Jahr : 04/1991 - 04/1994 im UK Rudolf Virchow,
Krankenhaus Moabit und Humboldt - Krankenhaus
III.Staatsexamen : 04/1994 vor dem LPA Berlin

Arzt im Praktikum : 1995 - 1997 in der Abteilung für Psychiatrie der
Waldhausklinik (Kliniken Theodor - Wenzel - Werk)
Assistenzarzt : 04 / 1997 in der Abteilung für Psychiatrie der Waldhausklinik
Dissertation : 12 / 1997 - 06 / 2000 Charité der Humboldt-Universität zu
Berlin und im Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in
Berlin Mitte
Assistenzarzt : 07 / 2000 - 12 / 2001 in der Abteilung für Psychiatrie und
Psychotherapie der Landesklinik Eberswalde
01 / 2002 - 05 / 2004 in der Abteilung für Psychiatrie und
Psychotherapie der St. Hedwig Kliniken
Seit 06 / 2004 in der Neurologischen Abteilung der Beelitzer
Kliniken

Berlin, im Juni 2005 Galip Karaali

12 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt zu haben. Außer der aufgeführten Literatur wurden keine zusätzlichen Hilfsmittel verwendet.

Berlin, im Juni 2005

Galip Karaali